

Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA

Member : AIPPI / KPA / KLES
Fax : (82-2) 556-5377 / 5969
Phone : 556-8224 ~ 8, 568-0461
Telex : 24928 (YSCHANG)

FILE COPY

提出書類写本

Kind of protection : PATENT

Applicant : NOVO NORDISK A/S

Title : Alkaline Lipase

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appln. No.
X	Application 出願書	June 22, 1995	95-702583
	Petition for Exam 出願審査請求書		
X	Power of Attorney 委任状	"	"
	Priority Document 優先権主張書類		
	Argument 意見書		
	Amendment 補正書		
	Printed Matter 審査参考資料		
	Appeal 抗告審判請求書		
Your Ref.No.		3949.204-KR,SLK/NRu	
Our Ref.No.		DK-5P-0549	

張龍植特許法律事務所
韓国 Seoul 光化門郵便局私書函 136号

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0025138

80

TRANSLATION

Please be advised that the following Application Number has been assigned to this case by the Korean Industrial Property Office as below :

NOTICE OF APPLICATION NUMBER

TO : Y.S.Chang, Attorney
 Appln. Date : December 22, 1993
 Applicant : Novo Nordisk A/S
 Filing Date of : June 22, 1995
 the Translation

Date: July 4, 1995
 Appln. No.: KPA No. 95-702583
 Request for Exam.: (yes, no)
 Commissioner
 Korean Industrial Property Office

Remarks

1. (Order of Examinations) Patent or Utility Model applications shall be examined in the order of the date Requesting Examination with the examination initiated only by formal Request. Design or trademark applications are automatically examined according to the filing dates.
2. (Request for Examination) The application shall be deemed withdrawn if the formal Request (Form No. 24 of the Patent Law Regulations) is not filed within 5-years of the Korean filing date for patents and 3 years for utility models.

Case	Official Fees for Requests for Examination
Patent Application	Basic fee : US\$96.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$ 22.00
Utility Model Application	Basic fee : US\$43.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$ 12.00

3. (Recordal of Changes) When the address or name of the applicant is changed, a request for recording the change (Form No. 4 of the Patent Law Regulations) must be immediately filed with the Korean Industrial Property Office.
4. (Payment of Official Fees) Payment of application or registration fees, etc. shall be made at any Korean National Treasury Bank in the official form required by then Korean Industrial Property Office; one of the receipts issued by the bank should be attached to the relevant documents. Alternatively, a Postal Money Order in the required amount may replace the bank payment and receipt.
5. (Reference) For questions, please contact the Inquiry Department (Tel. 568-8150/64) or Application Department (Tel. 568-6079) of the Korean Industrial Property Office.
6. (Address of the Korean Industrial Property Office) 823-1 Yeoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul, 135-784, Korea.

 요금후납	관인생략	Official Filing Certificate
	출원번호통지서 (PCT)	우편엽서
받는사람 (대리인) 장용식 주소 서울시 강남구 역삼동 824-20 (삼성빌딩)	1 3 5 - 0 8 0	
출원일자 1993.12.22. 심사청구 (무) 번역문제출일 1995. 6.22 출원번호 1995년 특허출원 제 702583 호		
출원인: 노보노르디스크아크티에셀스카브	특허청장	※ 이면참조

TRANSLATION

PAPER PURSUANT TO ARTICLES 201 and 203 OF THE KOREAN PATENT LAW

Applicant	NOVO NORDISK A/S Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark		
Attorney	Y. S. Chang J. S. Jeong	Code of Attorney	K020 K184
Inventor(s)	<p>Miyoko HASHIDA 3-22-205, Irifune Urayasu-shi, Chiba-ken 279 Japan</p> <p>Naoko IKEGAMI 1-18-10, Ichikawa Ichikawa-shi, Chiba-ken 272 Japan</p> <p>Masanobu ABO 2-5-3, Kohyadai Funabashi-shi, Chiba-ken 274 Japan</p> <p>Yukiko TAKAMURA 4-13-15, Motonakayama Funabashi-shi, Chiba-ken 273 Japan</p>		
Title of Invention	Alkaline Lipase		
International Appln. Number	PCT/DK93/00442	International Filing Date	Dec. 22, 1993

NZAS-0025140

TRANSLATION

Priority Claim pursuant to Art. 54 of the Patent Law	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Appln. No	Certified Document	
					attached	not attached
	Denmark	Patent	Dec.22, 1992	1529/92		0
	Denmark	Patent	Jan.28, 1993	96/93		0
	Denmark	Patent	Apr.20, 1993	442/93		0
<p>We are filing this document pursuant to Articles 201 and 203 of the Patent Law.</p> <p>June 22, 1995</p> <p>Y. S. Chang Patent Attorney J. S. Jeong Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>						
<p>Attached Documents :</p> <p>1. Paper and Translation of Specification, Claims, Abstract and Drawings Each 3 copies</p> <p>2. Power of Attorney with Translation Each 1 copy</p> <p>3. Priority Document with Translation (will be filed)</p> <p>4. Copy of the Deposit Receipt of Microorganisms with Translation Each 5 copies</p> <p>5. Translation of Amendment 2 copies</p>						
Official Filing Charges	Application	basic fee	20 pages	₩20,000		
		additional fee	30 pages	₩21,000		
	Priority Claiming fee			Priority Application : 3 cases	₩42,000	
	Request for Examination fee					
	Total				₩83,000	

특허법 제201조 및 제203조의 규정에 의한 서면

전수 이관			출원번호						
			담	당					
			심사관						
출원인	성명	노보 노르디스크 아크티에 셀스카브(Novo Nordisk A/S) 대표자 안네 제케르				국적	덴마크		
	주소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레							
대리인	성명	변리사 장용식, 정진상		대리인코드		K020, K184			
	주소	서울 강남구 역삼동 824-20 (전화번호 : 556-8224 ~6)							
발명자	성명	하시다 미요코			국적	일본국			
	주소	일본국 279 지바켄 우라야시 이리후네 3-22-205							
	성명	이케가미 나오키			국적	일본국			
	주소	일본국 272 지바켄 이치카와시 이치카와 1-18-10							
	성명	아보 마사노부			국적	일본국			
	주소	일본국 274 지바켄 후나바시시 고야다이 2-5-3							
	성명	타카무라 유키코			국적	일본국			
	주소	일본국 273 지바켄 후나바시시 모토나카야마 4-13-15							
발명의명칭		알칼리 리파아제 (ALKALINE LIPASE)							
국제출원번호		PCT/DK93/00442		국제출원일	1993. 12. 22.				
특허법 제54조의 특허권 주장	출원 국명	출원 종류	출원 일자	출원 번호	증명서류				
	덴마크	특허	1992. 12. 22. 1993. 1. 28. 1993. 4. 20.	1529/92 96/93 442/93	첨부	미첨부			
	○ ○ ○								
특허법 제 201조 및 동법 제 203조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 1995년 6월 22일 대리인 변리사 장용식 대리인 변리사 정진상 특허청장 귀하									
첨부서류 : 1. 서면, 명세서, 도면, 청구범위, 실시예, 문헌조사본, 특허청구의 범위, 번역문, (후술) 등 2. 서면, 명세서, 도면, 청구범위, 실시예, 문헌조사본, 특허청구의 범위, 번역문, (후술) 등 3. 서면, 명세서, 도면, 청구범위, 실시예, 문헌조사본, 특허청구의 범위, 번역문, (후술) 등 4. 서면, 명세서, 도면, 청구범위, 실시예, 문헌조사본, 특허청구의 범위, 번역문, (후술) 등 5. 서면, 명세서, 도면, 청구범위, 실시예, 문헌조사본, 특허청구의 범위, 번역문, (후술) 등				수 수 료					
				출원료	기본	20면	20,000원		
					가산	30면	21,000원		
							우선권주장료	3건	42,000원
							심사청구료		
			합 계	83,000원					

張龍植特許法律事務所

TEL 556-8224~6

NZAS-0025142

지정국(지역 또는 국가) 현황

지역특허

☒ EP 유럽특허 : AT 오스트리아, BE 벨지움, CH and LI 스위스, 리히텐슈타인, DE 독일, DK 덴마크, ES 스페인, FR 프랑스, GR 그리스, GB 영국, IE 아일랜드, IT 이태리, LU 룩셈부르크, MC 모나코, NL 네덜란드, PT 포르투갈, SE 스웨덴
그외 유럽특허조약 및 PCT 계약국

☐ OA OAPI 특허 : 베냉 Benin, 브르키나파소 Burkina Faso, 카메룬 Cameroon, 중앙아프리카 공화국, Central African Republic, 차드 Chad, 콩고 Congo, 가봉 Gabon, 말리 Mali, 모리타니아 Mauritania, 니제르 Niger, 세네갈 Senegal, 토고 Togo, 그외 OAPI 회원국이며 PCT 계약국(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하시오.)

국내특허(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하시오.)

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AT 오스트리아 Austria..... | <input type="checkbox"/> LU 룩셈부르크 Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AU 호주 Australia | <input type="checkbox"/> MC 마다가스카르 Madagascar..... |
| <input type="checkbox"/> BB 바베이도스 Barbados | <input type="checkbox"/> MN 몽고 Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG 불가리아 Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW 말라위 Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR 브라질 Brazil..... | <input type="checkbox"/> NL 네덜란드 Netherlands |
| <input type="checkbox"/> BY 벨라루스 Belarus | <input type="checkbox"/> NO 노르웨이 Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA 캐나다 Canada | <input type="checkbox"/> NZ 뉴질랜드 New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI 스위스, 리히텐슈타인
Switzerland, Liechtenstein..... | <input type="checkbox"/> PL 폴란드 Poland |
| <input type="checkbox"/> CZ 체코 Czech Republic..... | <input type="checkbox"/> PT 포르투갈 Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE 독일 Germany | <input type="checkbox"/> RO 루마니아 Romania |
| <input type="checkbox"/> DK 덴마크 Denmark | <input type="checkbox"/> RU 러시아연방 Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> ES 스페인 Spain | <input type="checkbox"/> SD 수단 Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI 핀란드 Finland | <input type="checkbox"/> SE 스웨덴 Sweden |
| <input type="checkbox"/> GB 영국 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SK 슬로바키아 Slovakia |
| <input type="checkbox"/> HU 헝가리 Hungary | <input type="checkbox"/> UA 우크라이나 Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 일본 Japan | <input checked="" type="checkbox"/> US 미국 United States of America..... |
| <input type="checkbox"/> KP 북한 Democratic People's
Republic of Korea | <input type="checkbox"/> VN 베트남 Viet Nam..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 대한민국 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ 카자흐스탄 Kazakhstan..... | |
| <input type="checkbox"/> LK 스리랑카 Sri Lanka | |

이 서식 발행이후 국내특허를 목적으로 PCT 계약국이된 국가를 지정하는 경우에는 다음에 기재하시오.

- ☐
☐

명 세 서

알칼리 리파아제

도면의 간단한 설명

제 1도 내지 제 7도는 다음 균주: S. griseus LB 501 (DSM 7349), S. griseus LB 502 (DSM 7350), S. coelicolor LB 511 (FERM BP-4236), S. coelicolor LB 512 (FERM BP-4237), S. griseus LB 524 (DSM 8672), S. coelicolor N 2293 (ATCC 23899) 및 S. parvus N 2300 (ATCC 12433)으로부터 유래된 본 발명의 리파아제 제제의 활성에 대한 pH 프로파일을 보여준다. 구체적인 사항은 실시예 6에서 주어진다.

제 8도는 본 발명의 리파아제 제제(LB 502로부터임) 및 공지기술인 위치 특이적 리파아제(리폴라제)에 의한 올리브유의 가수분해 후 라트로스겐으로부터 크로마토그램을 보여준다. 구체적인 사항은 실시예 8에서 주어진다.

제 9도는 본 발명의 리파아제 제제의 활성에 대한 Ca^{++} 첨가의 효과를 보여준다. 구체적인 사항은 실시예 11에서 주어진다.

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 예들들어서 세제에 유용한 새로운 위치 비특이적인 알칼리 리파아제에 관한 것이다.

본 발명은 또한 새로운 리파아제의 제조방법 및 새로운 리파아제로 이루어진 세제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

최근 5년동안 곰팡이 Humicola lanuginosa로부터 유래된 미생물 리파아제는 지방업묵의 제거를 개선하기 위하여 여러종류의 세제상품에 도입되어왔다. 다른 미생물 리파아제, 가령 Pseudomonas cepacia의 세균 리파아제도 또한 세제의 사용에 제안되어 왔다(US 4,876,024).

많은 세제들은 용액에서 높은 pH(예를들면 약 pH 10)를 갖는 알칼리성이고 Ca^{++} 이온을 결합시키기 위해 빌더를 포함한다.

본 발명의 목적은 Ca^{++} 의 부재하에 높은 pH에서 높은 활성을 갖는 리파아제를 제공하는 것이다. 이 리파아제는 트리글리세리드의 모든 에스테르 결합을 가수분해할 수 있도록 위치 비특이적이어야 한다.

발명의 개요

본 발명자는 이제 놀랍게도 Streptomyces 1군의 균주로부터 고 알칼리성, 위치 비특이적인 리파아제를 얻을 수 있다는 것을 발견하였다.

Streptomyces 1군의 균주는 이제까지 리파아제를 생성하는 것으로 알려지지 않았다.

따라서, 첫번째 관점에서 본 발명은;

- 1) 위치 비특이적이고,
- 2) 40°C에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용한 Ca^{++} 없는 분석에서 최적 pH 및 pH 10에서의 두활성을 측정했을때, pH 10에서 최적 pH에서의 활성의 50%이상인 활성을 가지며,
- 3) Streptomyces 1군의 균주의 배양에 의해 생성될 수 있는 리파아제 제제를 제공한다.

다른 관점에서, 본 발명은;

- 1) 위치 비특이적이고,
- 2) 40℃에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알코올을 사용하여 측정했을때 pH 9 내지 pH 11의 범위에서 최적활성을 가지며,
- 3) Streptomyces 1 군의 군주에 고유한 세포외의 리파아제와 면역학적으로 동일한 리파아제를 제공한다.

세번째 관점에서, 본 발명은 본 발명의 리파아제 제제의 제조방법을 제공하는데, 이것은 탄소원, 질소원 및 무기염을 포함하는 적당한 영양배지에서 Streptomyces 1군의 리파아제 생성군주를 배양하고 그후 원하는 효소를 회수하는 것으로 이루어진다.

다른 관점에서 본 발명은 본 발명의 리파아제로 이루어진 새제조성물을 제공한다.

발명의 상세한 설명

미생물

본 발명에 사용된 미생물 군주는 S. T. Williams et al., 에 의해 Journal of General Microbiology (1983), 129, 1743-1813 에서 정의된 것과 같이 Streptomyces 1군에 속하는 Actinomycetales 목의 새균이다.

Streptomyces 1군에서 다음의 아군, 종 및 군주가 바람직하다.

상기한

리파아제를 생성할 수 있는 그들의 변이체 및 돌연변이체도 또한 본 발명에서 사용될 수 있다.

아군	종	균주
1 A	<i>S. albidoflavus</i>	
	<i>S. coelicolor</i>	ATCC 23899
		FERM BP-4236
		FERM BP-4237
	<i>S. limosus</i>	ATCC 19778(표준균주)
1 B	<i>S. albobiridis</i>	ATCC 25425(표준균주)
	<i>S. griseus</i>	ATCC 23345(표준균주)
		DSM 7349
		DSM 7350
		DSM 8672
	<i>S. parvus</i>	ATCC 12433(표준균주)
	<i>S. setonii</i>	ATCC 25497(표준균주)
1 C	<i>S. nitrosporeus</i>	ATCC 12769(표준균주)

상기 언급된 ATCC 균주는 미합중국 메릴랜드주 락빌 파크론 드라이브 12301에 있는
아메리칸 타입 컬처 컬렉션에서 자유롭게 얻을 수 있다.

다음의 균주들은 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부타페스트 조약에
따라 발명자에 의해 기탁되었다. 균주들은 하기에서 보여지는 바와같이
분류되었다.

분류학상의 위치	수탁번호	기탁일자	기탁자가 부여한 식별표시
<i>S. griseus</i>	DSM 7349	1992. 12. 10.	LB 501
<i>S. griseus</i>	DSM 7350	1992. 12. 10.	LB 502
<i>S. griseus</i>	DSM 8672	1993. 11. 2.	LB 524
<i>S. coelicolor</i>	FERM BP-4236	1993. 3. 10.	LB 511
<i>S. coelicolor</i>	FERM BP-4237	1993. 3. 10.	LB 512

여기에서 DSM은 독일 브라운슈바이크 3300 마체로더 베그 1베에 있는 도이쉴람 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨루렌(DSM)에 기탁한 것을 나타낸다. FERM은 일본국 305 이바라기켄 츠쿠바시 허가시 1초메 1반 3고에 있는 국제통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술 연구소(NIBHT)에 기탁한 것을 나타낸다.

리파아제의 위치 특이성

리파아제의 위치 특이성은 트리글리세리드의 부분적 가수분해와 형성되는 디글리세리드의 분석에 의해 조사될 수도 있다. 본 발명의 리파아제는 1,3-디글리세리드 및 1,2-디글리세리드 모두를 형성하고 따라서 이 리파아제는 위치 비특이적, 즉 트리글리세리드의 모든 세개의 에스테르 결합과 반응한다.

알칼리 pH에서의 리파아제 활성

본 발명에 의해 제공된 리파아제(지방분해 효소)는 고알칼리성이다. 40℃에서 20 분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용해서 Ca^{++} 의 부재하에 측정했을 때, 리파아제는 pH 10에서 최적활성의 50%이상(바람직하게는 80% 이상)인 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

또한 40℃에서 20 분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용해서 측정했을 때, 본 발명의 리파아제는 pH 9 이상에서 최적 활성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 최적 pH가 9 내지 11의 범위, 가령 pH 9.5 이상이고, 가장 바람직하게는 pH 10 이상, 가령 pH 9.5 내지 pH 10.5의 범위이다.

세제 존재하에서의 리파아제 활성

본 발명의 바람직한 리파아제는 세제의 존재하에서 높은 활성을 보유한다. 본 발명의 리파아제는 pH 10.2의 세제용액에서 pH 10인 글리신 또는 디에탄올 아민 완충액에서의 활성의 50%이상인 활성을 갖는 것을 특징으로 하는데, 이때 두 활성은 60 분

반응시간 동안 기질로서 올리브유를 사용하여 측정하였고, 세제용액은 0.35g/ℓ 선형 알킬 벤젠설포네이트, 0.15g/ℓ 알콜 에톡실레이트, 1.25g/ℓ 삼인산나트륨, 1.00g/ℓ 황산나트륨, 0.45g/ℓ 탄산나트륨 및 0.15g/ℓ 메타규산나트륨으로 구성된다.

또한 바람직한 리파아제는 pH 7.5 의 세제용액에서 같은 pH 의 완충액에서의 활성의 적어도 75%인 활성을 갖는 것을 특징으로 할 수도 있는데, 이때 두 활성은 40℃에서 30분 반응시간동안 기질로서 P- 니트로페닐부티레이트를 사용하여 측정하였고, 완충액은 0.2M Tris-HCl 이며, 세제용액은 0.1% 알콜에톡실레이트 또는 선형 알킬 설포네이트이다.

세제 용액에서 지적인 활성을 갖는 리파아제는 Streptomyces 아군 1A 또는 1B, 예를들면 종 S. griseus, S. coelicolor 또는 S. parvus, 특히 균주 S. griseus DSM 7349, DSM 7350, DSM 8672, S. coelicolor FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899 또는 S. parvus ATCC 12433 에서 얻을 수 있다.

Ca⁺⁺부제하에서의 리파아제 활성

특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 리파아제는 Ca⁺⁺부제하에서 50mM Ca⁺⁺존제하에서의 활성의 50%이상인 활성을 갖는데, 이때 두 활성은 하기에서 기술된 올리브유 /PVA 방법에 의해 측정한다.

Ca⁺⁺부제하에 언급된 활성을 갖는 리파아제를 생성할 수 있는 미생물 균주는 새로운 것이고 본 발명에 의해 제공된다. 바람직한 균주는 S. griseus DSM 7350이다.

면역화학적 성질

Streptomyces 1군의 균주에 고유한 세포외의 리파아제와 동일하거나 부분적으로 동일한 면역화학적 특성을 갖고, 높은 pH 에서 언급된 활성을 갖는 위치 비특이적인 리파아제들은 본 발명의 범위내이다.

면역화학적 특성은 면역학적 교차-반응 동일성 테스트에 의해서 결정할 수 있다.

이 동일성 테스트는 잘 알려진 오우체로니(Duchterlony) 더블 면역확산법 또는 I. M. Roitt:

면역학, Gover 의학 출판부(1985) 및 N. H. Axelsen: 결상의 면역침전법 안내서, Blackwell

과학출판부 (1983), 5장 및 14장에 의한 탠덤 교차 면역전기영동법에 의해 수행할 수

있다. 면역화학적 동일성(항원 동일성) 및 부분 면역화학적 동일성(부분항원

동일성) 용어는 Axelsen의 상기 책 5, 19 및 20 장 및 Roitt의 상기 책 6 장에 기술되어

있다.

면역학적 테스트에 사용하기 위한 단일 특이적 항혈청은, 예를들면, N. H. Axelsen의
상기 책 41 장 또는 N. H. Axelsen et al.,의 정량적 전기영동법의 안내서, Blackwell 과학
출판부 (1973), 23 장에서 기술되어 있는 것과같이 정제된 리파아제에 대해, 예를들면
토끼에서 모을 수 있다.

리파아제 활성 측정

리파아제 활성은 폴리비닐 알콜로 유화된 올리브유를 기질로 사용하여 측정한다(부피
비 1:3 의 올리브유 및 2% PVA 용액; PVA, $n=1750 \pm 50$). 리파아제용액 0.1ml,

200mM 디에탄올 아민 완충액 0.2ml 및 올리브유/PVA 유탁액 0.2ml의 혼합물을 40℃에서

10분 또는 20분동안 교반한다. 반응은 1 N HCl 0.1ml의 첨가에 의해 종결된다.

종결후, 내부 기준으로 0.1% 리토콜린산을 함유하는 클로로포름과 메탄올의 1:1혼합물

2.0ml 을 반응액에 첨가한 다음, 반응액을 격렬하게 혼합한다.

침강후에, 용매층을 제거하고 방출된 지방산을 TLC-FID 분석(라트로스켄™)에 의해 측정
한다.

리파아제의 제조

본 발명의 리파아제는 탄소원, 질소원, 및 무기염을 포함하는 적당한 영양배지에서

상기한 미생물 중 하나를 배양한후, 이들로부터 리파아제를 회수함으로써 제조될 수 있다.

또한 리파아제는 이 기술분야에서 알려진 방법에 따라 제조한 DNA- 기술에 의해 얻을 수 있다.

예를들면, 리파아제를 암호화하는 DNA 단편을 분리하고, 적당한 벡터에 적당한 발현 시그널과 DNA 단편을 결합하고, 이 벡터나 이들의 요소를 적당한 숙주(예를들어 Escherichia coli,

Bacillus, Streptomyces 또는 Saccharomyces 속의 구성원 또는 섬유상 곰팡이, 바람직하게는

Aspergillus속의 구성원)로 자율복제 플라스미드로서 또는 염색체에 통합해서 도입하고,

리파아제의 발현을 이끄는 조건하에서 숙주생물을 배양하고, 이 배양액으로부터 리파아제를 회수한다.

배양후, 리파아제는 배양액으로부터 회수되고 소수성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 이들의 조합과 같은 종래방법에 의해서 정제될 수도 있다.

리파아제의 이용

본 발명의 리파아제는 종래 리파아제의 이용분야, 특히 높은 pH 에서, 예를들어 세탁 및 식기 세척용 세제, 기업용 및 공업용 세탁 및 가죽공정에 이용할 수도 있다.

본 발명의 리파아제는 위치 비 특이적(즉 트리글리세리드의 모든 3개의 에스테르 결합을 가수분해할 수 있음)이고, 이것은 또한 지방과 오일의 전체적인 가수분해에도 이용할 수 있다.

리파아제는 중성 pH 부근에서 열에 대해 더 안정하므로, 적당한 조건은 pH 7, 60°C일 수 있다.

세탁세제 조성물

본 발명에 따라서 리파아제는 전형적으로 세제조성물의 한 성분일 수 있다.

따라서 리파아제는 비분말성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태로 세제

조성물에 포함될 수 있다. 비분말성 과립은 예를들어 US 4,106,991 및 4,661,452 (둘다 노보 인두스트리 아크티에 셀스카브의 특허) 에 기술된 것과같이 제조될 수 있고 이 기술분야에서 알려진 방법에 의해 선택적으로 코팅될 수도 있다. 왁스 코팅제의 예는 1000 내지 20000의 평균몰 중량을 갖는 폴리(에틸렌 산화물) 생성물(폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50의 에틸렌 산화물 유니트를 갖는 에톡실화된 노닐페놀; 알콜이 12 내지 20의 탄소원자를 포함하고 15 내지 80의 에틸렌 산화물 유니트가 있는 에톡실화된 지방알콜; 지방알콜; 지방산; 지방산의 모노-, 디- 및 트리글리세리드등이다. 유체층법에 의한 사용에 적당한 필름-형성 코팅제의 예는 특허 GB 1483591에 주어진다. 액체 효소제제는 예를들어 확립된 방법에 따라 프로필렌 글리콜과 같은 폴리올, 당 또는 당알콜, 젖산 또는 붕산의 첨가에 의해 안정화될 수도 있다. 다른 효소 안정화제가 이 기술분야에서 잘 알려져 있다. 보호된 효소는 EP 238,216에서 설명된 방법에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 세제조성물은 예를들어 분말, 과립, 페이스트 또는 액체와 같은 어떤 편리한 형태일 수 있다.

액체세제는 전형적으로 70%의 물 및 0~30% 유기용매를 포함하는 수성이거나 또는 비수성일 수도 있다.

세제조성물은 음이온성, 비이온성, 양이온성 또는 양쪽성일 수 있는 각 계면활성제를 한개 이상 포함한다.

이 세제는 대개 선형 알킬벤젠설포네이트(LAS), 알파-올레핀설포네이트(AOS), 알킬 설페이트(지방알콜 설페이트)(AS), 알콜에톡시설페이트(AEOS 또는 AES), 2차 알칸 설포네이트(SAS), 알파-술포 지방산 메틸에스테르, 알킬- 또는 알케닐숙신산 또는 비누와 같은 음이온 계면활성제를 0-50% 포함한다. 세제는 또한 알콜 에톡실레이트(AEO 또는 AE), 카르복실화된 알콜에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬디메틸

아민산화물, 에폭실화된 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 알킬-(N-메틸)-글루코스아미드 또는 폴리히드록시 알킬지방산 아미드(가령 WO 92/06154에 기술)와 같은 비이온성 계면활성제를 0-40% 포함할 수도 있다.

세제조성물은 부가적으로 아밀라제, 유티나제, 프로테아제, 셀룰라제, 퍼옥시다제 및 옥시다제와 같은 다른 효소를 한계 이상 포함할 수 있다.

세제는 제올라이트, 이인산염, 삼인산염, 포스포네이트, 시트르산염, 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌디아민테트라 아세트산(EDTA), 디에틸엔트리아민펜타아세트산(DTMPA), 알킬- 또는 알케닐숙신산, 가용성 규산염 또는 규산염 층(가령 Hoechst의 SKS-6)과 같은 세제빌더 또는 혼합제를 1-65% 포함한다. 세제는 또한 본질적으로 세제빌더가 없을 수도 있다.

세제는 한계 이상의 폴리머를 포함할 수 있다.

폴리머의 예는 카르복시메틸셀룰로스(CMC), 폴리(비닐피롤리돈)(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리(비닐알콜)(PVA), 폴리아크릴레이트와 같은 폴리카르복실레이트, 말레산/아크릴산의 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산의 공중합체 등이다.

세제는 과불산염이나 과탄산염과 같은 과산화수소원을 포함하고 테트라아세틸에틸렌디아민(TAED) 또는 노나노일옥시벤젠설포네이트(NOBS)와 같은 과산-형성 표백 활성제와 조합될 수 있는 표백시스템을 포함할 수 있다. 또한 표백시스템은 가령 아미드, 이미드 또는 술포형태의 퍼옥시산을 포함할 수 있다.

본 발명의 세제조성물의 효소는 종래의 안정화제, 예를들어, 프로필렌 글리콜이나 글리세롤과 같은 폴리올, 당이나 당알콜, 젖산, 붕산 또는 가령 방향족 붕산 에스테르와 같은 붕산유도체 등에 의해 안정화될 수 있고, 세제조성물은 예를들어 WO 92/19709 및 WO 92/19708에서 기술된 것과같이 조제될 수도 있다.

세제는 또한 종래의 다른 세제 성분, 예를들어 점토를 포함하는 직물연화제, 거품촉진제, 비누거품 억제제, 부식방지제, 얼룩연락제, 얼룩제침전 방지제, 염료, 살균제, 광증백제, 또는

향료 등을 포함한다.

pH(사용농도의 수용액에서 측정)는 대개 중성 또는 알칼리성, 가령 7-11 일 것이다.

본 발명의 범위내의 세제조성물의 구체적 형태는 다음을 포함한다.

- 1) - 선형 알킬벤젠설포네이트
(산으로 계산) 7-12%
- 알콜 에톡시설포에이트
(가령 C₁₂-18 알콜, 1-2EO) 또는
알킬설포에이트(가령 C₁₆-18) 1-4%
- 알콜 에톡시실레이트
(가령 C₁₄-16 알콜, 7EO) 5-9%
- 탄산나트륨(Na₂CO₃) 14-20%
- 가용성 규산염(Na₂O, 2SiO₂) 2-6%
- 제올라이트(NaAlSiO₄) 15-22%
- 황산나트륨(Na₂SO₄) 0-6%
- 시트르산나트륨/ 시트르산
(C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇) 0-15%
- 과붕산나트륨(NaBO₃·H₂O) 11-18%
- TAED 2-6%
- 카르복시메틸셀룰로스 0-2%
- 폴리머(가령 말레인산/ 아크릴산
공중합체, PVP, PEG) 0-3%
- 효소 0-5%
- 미량성분(가령 비누거품 억제제,

향료, 광증백제, 광표백제)

0-5%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립의 형태로 조제된 세제조성물.

2) - 선형 알킬벤젠설포네이트

(산으로 계산)

6-11%

- 알콜 에톡시설포레이트

(가령 C₁₂-18 알콜, 1-2EO) 또는

알킬설포이트(가령 C₁₈-18)

1-3%

- 알콜 에톡시레이트

(가령 C₁₄-16 알콜, 7EO)

5-9%

- 탄산나트륨(Na₂CO₃)

15-21%

- 가용성 규산염(Na₂O, 2SiO₂)

1-4%

- 제올라이트(NaAlSiO₄)

24-34%

- 황산나트륨(Na₂SO₄)

4-10%

- 시트르산나트륨/시트르산

(C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇)

0-15%

- 카르복시메틸셀룰로오스

0-2%

- 폴리머(가령 말레인산/아크릴산

공중합체, PVP, PEG)

1-6%

- 효소

0-5%

- 미량성분(가령 비누거품 억제제, 향료)

0-5%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립형태로 조제된 세제조성물.

3) - 선형 알킬벤젠설포네이트

(산으로 계산)

5-9%

- 알콜 에톡실레이트	
(예를들면 C ₁₂ -15 알콜, TE0)	7-14%
- 지방산 비누	
(가령 C ₁₆ -22)	1-3%
- 탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	10-17%
- 가용성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	3-9%
- 제올라이트 (NaAlSiO ₄)	23-33%
- 황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0-4%
- 과불산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O)	8-16%
- TAED	2-8%
- 포스포네이트 (가령 EDTMPA)	0-1%
- 카르복시메틸셀룰로스	0-2%
- 폴리머 (예를들어 말레인/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1-3%
- 효소	0-5%
- 미량성분 (비누거품 억제제, 향료, 광증백제)	0-5%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립형태로 조제된 세제조성물.

4) - 선형 알킬벤젠설포네이트	
(산으로 계산)	8-12%
- 알콜 에톡실레이트	
(예를들면 C ₁₂ -15 알콜, TE0)	10-25%
- 탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14-22%

- 가용성 규산염(Na_2O , 2SiO_2)	1-5%
- 제올라이트(NaAlSiO_4)	25-35%
- 황산나트륨(Na_2SO_4)	0-10%
- 카르복시메틸셀룰로스	0-2%
- 폴리머(예를들어 말레인/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1-3%
- 효소	0-5%
- 미량성분(비누거품 억제제, 향료)	0-5%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립형태로 조제된 세제조성물.

5) - 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산)	15-21%
- 알콜 에톡실레이트 (가령 C_{12-15} 알콜, 7EO 또는 C_{12-15} 알콜, 5EO)	12-18%
- 지방산(가령 올레산) 비누	3-13%
- 알케닐숙신산(C_{12-14})	0-13%
- 아미노에탄올	8-18%
- 시트르산	2-8%
- 포스포네이트	0-3%
- 폴리머(가령 PVP, PEG)	0-3%
- 붕산염(B_4O_7)	0-2%
- 에탄올	0-3%
- 프로필렌 글리콜	8-14%

- 효소 0-5%

- 미량성분(가령 분산제, 비누거품 억제제,
향료, 광증백제) 0-5%

으로 이루어진 수성 액체 세제조성물.

- 6) - 선형 알킬벤젠설포네이트
(산으로 계산) 15-21%
- 알콜 에톡실레이트
(예를들어 C₁₂-15 알콜 7EO 또는
C₁₂-15 알콜, 5EO) 3-9%
- 지방산(가령 올레산) 비누 3-10%
- 제올라이트(NaAlSiO₄) 14-22%
- 시트르산칼륨 9-18%
- 붕산염(B₄O₇) 0-2%
- 카르복시메틸셀룰로스 0-2%
- 폴리머(가령 PEG, PVP) 0-3%
- 라우릴 메타릴레이트/아크릴산
공중합체와 같은 고정 폴리머;
물 비율 25:1; MW 3800 0-3%
- 글리세롤 0-5%
- 효소 0-5%
- 미량성분(분산제, 비누거품 억제제,
향료, 광증백제) 0-5%

으로 이루어진 수성 액체 세제조성물.

7)	- 지방알콜 설페이트	5-10%
	- 에톡실화된 지방산 모노에탄올아미드	3-9%
	- 지방산 비누	0-3%
	- 탄산나트륨(Na_2CO_3)	5-10%
	- 가용성 규산염(Na_2O , 2SiO_2)	1-4%
	- 제올라이트(NaAlSiO_4)	20-40%
	- 황산나트륨(Na_2SO_4)	2-8%
	- 과붕산나트륨($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	12-18%
	- TAED	2-7%
	- 폴리머(예들들어 말려산/ 아크릴산 공중합체, PEG)	1-5%
	- 효소	0-5%
	- 미량성분(예들들면 광중백제, 비누거품 억제제, 향료)	0-5%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립형태로 조제된 세제조성물.

8)	- 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산)	8-14%
	- 에톡실화된 지방산 모노에탄올아미드	5-11%
	- 지방산 비누	0-3%
	- 탄산나트륨(Na_2CO_3)	4-10%
	- 가용성 규산염(Na_2O , 2SiO_2)	1-4%
	- 제올라이트(NaAlSiO_4)	30-50%
	- 황산나트륨(Na_2SO_4)	3-11%

- 시트르산나트륨($C_6H_5Na_3O_7$)	5-12%
- 폴리머(예를들면 PVP, 말레인/아크릴산 공중합체, PEG)	1-5%
- 효소	0-5%
- 미량성분(가령 비누거품 억제제, 향료)	0-5%

으로 이루어진 과립형태로 조제된 세제조성물.

9) - 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산)	6-12%
- 비이온성 계면활성제	1-4%
- 지방산 비누	2-6%
- 탄산나트륨(Na_2CO_3)	14-22%
- 제올라이트($NaAlSiO_4$)	18-32%
- 황산나트륨(Na_2SO_4)	5-20%
- 시트르산나트륨($C_6H_5Na_3O_7$)	3-8%
- 과붕산나트륨($NaBO_3 \cdot H_2O$)	4-9%
- 표백활성제(예를들면 NOBS 또는 TAED)	1-5%
- 카르복시메틸셀룰로스	0-2%
- 폴리머(가령 폴리카르복실레이트 또는 PEG)	1-5%
- 효소	0-5%
- 미량성분(가령 광증백제, 향료)	0-5%

으로 이루어진 과립형태로 조제된 세제조성물.

10) - 선형 알킬벤젠설포네이트	
--------------------	--

(산으로 계산)	15-23%
- 알콜 에톡시설테이트	
(예를들면 C ₁₂ -15 알콜, 2-3EO)	8-15%
- 알콜 에톡실레이트	
(예를들면 C ₁₂ -15 알콜, 7EO 또는	
C ₁₂ -15 알콜, 5EO)	3-9%
- 지방산(예를들면 라우린산) 비누	0-3%
- 아미노에탄올	1-5%
- 시트르산나트륨	5-10%
- 향수성 물질(가령, 폴루엔설프오네이트	
나트륨)	2-6%
- 붕산염(B ₄ O ₇)	0-2%
- 카르복시메틸셀룰로스	0-1%
- 에탄올	1-3%
- 프로필렌 글리콜	2-5%
- 효소	0-5%
- 미량성분(가령, 폴리머, 분산제, 향료,	
광증백제)	0-5%

으로 이루어진 수용성 액체 세제조성물.

11) - 선형 알킬벤젠설프오네이트

(산으로 계산) 20-32%

- 알콜 에톡실레이트

(예를들면 C₁₂-15 알콜, 7EO 또는

C ₁₂ -15 알콜, 5EO)	6-12%
- 아미노에탄올	2-6%
- 시트르산	8-14%
- 붕산염(B ₄ O ₇)	1-3%
- 폴리머(가령 말레산/아크릴산 공중합체, 가령 라우릴메타크릴레이트/ 아크릴산 공중합체 같은 고정제 폴리머 및 CMC)	0-3%
- 글라세들	3-8%
- 효소	0-5%
- 미량성분(가령 향수성물질, 분산제, 향료, 광증백제)	0-5%

으로 이루어진 수성 액체 세제조성물.

- 12) - 음이온성 계면활성제(선형 알킬벤젠-
설포네이트, 알킬설포네이트, 알파-올레핀
설포네이트, 알파-술폰 지방산 메틸
에스테르, 알칸설포네이트, 비누)
25-40%
- 비이온성 계면활성제
(가령 알콜 에톡실레이트)
1-10%
- 탄산나트륨(Na₂CO₃)
8-25%
- 가용성 규산염(Na₂O, 2SiO₂)
5-15%
- 황산나트륨(Na₂SO₄)
0-5%
- 제올라이트(NaAlSiO₄)
15-28%

- 과붕산나트륨 ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0-20%
- 표백활성제 (TAED 또는 NOBS)	0-5%
- 효소	0-5%
- 미량성분 (가령 향료, 광증백제)	0-3%

으로 이루어진 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립형태로 조제된 세제조성물.

13) 1)-12)에 기술된 세제조제물로서 선형 알킬벤젠 설포네이트의 함량 또는 그것의 일부가 알킬설페이트(C_{12-18})에 의해 치환된 세제조제물.

14) 1)-13)에 기술된 세제조제물로서 추가성분으로서 또는 이미 명시된 표백 시스템의 대체물로서 안정화되거나 캡슐화된 과산을 포함하는 세제조제물.

15) 3), 7), 9) 및 12)에 기술된 세제조제물로서 과붕산염의 함량이 과탄산염에 의해 치환된 세제조성물.

16) 선형 알코실화된 1차 알콜, 빌더시스템(예를들면 인산염), 효소 및 알칼리와 같은 액체 비이온성 계면활성제로 이루어진 비수성 세제액체로서 조제된 세제조성물. 이 세제는 또한 음이온성 계면활성제 및/또는 표백시스템을 포함할 수 있다.

본 발명의 리파아제는 세제에 종래 사용된 농도로 혼합될 수 있다. 본 발명의 세제조성물에서 리파아제는 세탁액 리터당 50-10,000LU, 바람직하게는 100-2,000LU/l, 또는 세제그램당 50-50,000LU, 바람직하게는 500-10,000LU/g에 상당하는 양으로 첨가할 수 있다고 현재 생각된다. 리파아제 단백질의 양은 세탁액 리터당 0.001-100mg 또는 세제그램당 0.001-100mg일 수 있다.

식기 세척 조성물

식기 세척 세제조성물은 음이온성, 비이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 이들 형태의 혼합물일 수 있는 계면활성제를 포함한다. 세제는 거품이 적게 일거나 또는 일지않는 에톡실화 되고 프로폭실화된 직쇄 알콜과 같은 비이온성 계면활성제를 0-90% 포함할 것이다.

세제조성물은 무기염 및/ 또는 유기염형태의 세제빌더를 포함한다.

세제빌더는

인- 함유형 및/ 또는 인- 비함유형일 수 있다.

세제조성물은 대개 세제 빌더를 1-90% 포함한다.

인- 함유 무기 알칼리성 세제빌더의 예는 특히 알칼리금속 피로포스페이트, 오르토 포스페이트, 폴리포스페이트 및 포스포네이트와 같은 수용성 염을 포함한다.

인- 비함유 무기 빌더의 예는 제올라이트가 대표적으로 잘알려져 있는 비수용성 결정질 또는 비결정질 규산알루미늄의 여러 유형뿐만 아니라 수용성 알칼리 금속의 탄산염, 붕산염 및 규산염을 포함한다.

적당한 유기-빌더의 예는 알칼리 금속, 암모늄과 치환된 암모늄, 시트르산염, 숙신산염, 말산염, 지방산 설포네이트, 카르복시메톡시 숙신산염, 암모늄 폴리아세트산염, 카르복실산염, 폴리카르복실산염, 아미노폴리카르복실산염, 폴리아세틸 카르복실산염 및 폴리히드록시설포네이트를 포함한다.

다른 적당한 유기 빌더는 빌더의 특성을 갖는 것으로 알려진 고분자량 중합체와 공중합체, 예를들어 적당한 폴리아크릴산, 폴리말레산 및 폴리아크릴산/ 폴리말레산 공중합체와 그들의 염등을 포함한다.

식기 세척 세제조성물은 염소/ 브롬- 형 또는 산소- 형의 표백제를 포함할 수 있다. 무기 염소/ 브롬- 형 표백제의 예는 염소화된 인산삼나트륨뿐만 아니라 리튬, 나트륨 또는 칼슘의 하이포아 염소산염 및 하이포아브롬산염 등이다. 유기 염소/ 브롬- 형 표백제의 예는 트리클로로이소시아누르산, 트리브로모이소시아누르산, 디브로모이소시아누르산 및 디클로로이소시아누르산과 칼륨 및 나트륨과 같은 수용성 양이온과의 이들의 염등과 같은 헥테로 고리의 N- 브로모 및 N- 클로로 이미드이다.

히단토인 화합물도 또한 적당하다.

산소 표백제는 예를들면 바람직하게는 표백전구체를 갖거나 또는 퍼옥시산 화합물인

무기과염의 형태가 바람직하다. 적당한 퍼옥시 표백화합물의 전형적인 예는 알칼리 금속 과붕산염과 4수화물과 1수화물, 알칼리 금속의 과탄산염, 과규산염 및 과인산염 등이다. 바람직한 활성제는 TAED 및 글리세롤 트리아세테이트이다.

본 발명의 식기 세척 세제조성물은 종래의 효소안정제, 예를들면 프로필렌 글리콜과 같은 폴리올, 당 또는 당알콜, 젖산, 붕산, 또는 예들들어 방향족 붕산 에스테르 같은 붕산 유도체 등을 사용해서 안정화될 수도 있다.

본 발명의 식기 세척 세제조성물은 또한 종래의 다른 세제성분, 예를들면 응집방지제, 충전제, 거품억제제, 부식방지제, 얼룩연탁제, 봉쇄제, 얼룩제침적 방지제, 탈수제, 염료, 살균제, 형광제, 침강농축제 및 향료등을 포함할 수도 있다.

결론적으로 본 발명의 리파아제는 종래의 식기 세척 세제, 예를들면 다음 특허공보 중 어느 것에서 기술된 어느 세제에도 사용될 수 있다.

EP 551670, EP 533239, WO 9303129, EP 507404, US 5141664, GB 2247025, EP 414285, GB 2234980, EP 408278, GB 2228945, GB 2228944, EP 387063, EP 385521, EP 373851, EP 364260, EP 349314, EP 331370, EP 318279, EP 318204, GB 2204319, EP 266904, US 5213706, EP 530870, CA 2006687, EP 481547, EP 337760, WO 93/14183, US 5223179, WO 93/06202, WO 93/05132, WO 92/19707, WO 92/09680, WO 92/08777, WO 92/06161, WO 92/06157, WO 92/06156, WO 91/13959, EP 399752, US 4941988, US 4908148.

실시예

다음 예들은 본 발명을 더 설명하나, 이들은 청구된 발명의 범위를 제한하려고 의도된 것은 아니다.

실시예 1

리파아제의 제조

시드배양물은 다음 조성(g/ 리터) 의 왁스만 배지가 있는 각 셰이크 플라스크에서 각각 LB 501(DSM 7349), LB 502 (DSM 7350), LB 511 (FERM BP-4236) 및 LB 512 (FERM BP-4237)의 균주로부터 생성하였다.

글루코스	10
펩톤	5
고기즙	5
NaCl	5
pH를 7.0으로 조정	

30℃ 및 230rpm-에서 2일후에, 시드배양물 5ml을 다음의 배지(g/ l) 100ml을 포함하는 셰이크 플라스크에 접종하였다.

파마메디아™ (프록터 & 갬블 오일씨드
프로덕트 Co., 트레이더 프로틴에서

구입)	20g
옥수수침지분말	10g
글리세롤	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g

가압멸균전에 pH 를 7.0으로 조정

20분/121℃ 가압멸균

조조바유 1ml를 각 셰이크 플라스크에 첨가하였고, 이 플라스크는 27℃, 230rpm에서 4 일동안 배양하였다.

배양액을 원심분리에 의해 액상/ 고형으로 분리하였다.

상징액을 냉동- 건조

시켰으며, 정제되지 않은 분말 계계를 얻었다.

실시예 2

리파아제의 제조

하기에서 지시하는 바와같이 다음의 조성을 갖는 ACT-1, ACT-2, ACT-3, ACT-4 및 ACT-5로 표시되는 배양배지를 100ml 포함하는 250ml 셰이크 플라스크에서 균주를 배양하였다(ml/SF는 셰이크 플라스크 당 ml 을 가리킨다).

	ACT-1	ACT-2	ACT-3	ACT-4	ACT-5
파마메디아 (g/l)	20	20	20	20	20
C.S.P. (g/l)	10	10	10		10
N.Z. 아민 (g/l)				10	
글리세롤 (g/l)	10	10	10	10	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄ (g/l)	1	1	1	1	1
조조바유 (ml/SF)	1		1	1	2
대우유 (ml/SF)		2			
pH 조절	6.0	6.5	6.5	6.0	6.0

27℃에서 4일동안 각 균주를 배양하였다. 배양의 말기에 배양액의 pH 및 리파아제 활성(LU)을 측정하였다.

1 리파아제 유닛(LU)은 표준조건(즉, 30.0℃; pH 7.0; 및 트리부티린 기질) 하에서 분당 1μmol 의 적정가능 부티르산을 유리시키는 효소의 양이다. 결과;

종	균주	배양배지	배양후 pH	LU/ml
<i>S. griseus</i>	LB 501	ACT-1	8.1	8.0
<i>S. griseus</i>	LB 502	ACT-2	8.3	3.0
<i>S. griseus</i>	LB 524	ACT-1	8.3	3.5
<i>S. coelicolor</i>	LB 511	ACT-5	8.7	6.5
<i>S. coelicolor</i>	LB 512	ACT-3	8.2	6.4
<i>S. coelicolor</i>	ATCC 23899	ACT-1	8.6	4.5
<i>S. parvus</i>	ATCC 12433	ACT-1	8.4	3.1

실시예 3

리파아제의 제조

하기에서 지시하는 바와 같이, 27℃에서 ACT-1 배양배지(실시예 2에서 기술) 를 포함하는 셰이크 플라스크에서 균주를 배양하였다. 배양액의 pH 및 리파아제 활성은 3,4 및 5일후에 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다:

종	균주	일	LU 활성	pH
<i>S. griseus</i>	LB 502 (DSM 7350)	3	10.6	8.3
		4	10	8.7
		5	10	8.9
<i>S. coelicolor</i>	ATCC 23899	3	5.2	6.8
		4	6.1	8.0
		5	2.6	8.6
<i>S. limosus</i>	ATCC 19778	3	0.6	7.1
		4	1.5	7.1
		5	2.2	7.5
<i>S. albobirdis</i>	ATCC 25425	3	1.8	8.1
		4	4.6	8.4
		5	5.2	8.8

종	균주	일	LI 활성	pH
<i>S. griseus</i>	ATCC 23345	3	2.1	7.9
		4	2.9	8.1
		5	7.0	8.3
<i>S. parvus</i>	ATCC 12433	4	0.6	8.1
		5	1.2	8.2
<i>S. setonii</i>	ATCC 25497	3	35	7.6
		4	56	7.9
		5	72	8.3
<i>S. nitrosporeus</i>	ATCC 12769	3	0.5	7.4
		4	0.2	7.9
		5	0.7	8.0

실시예 4

S. griseus LB 502(DSM 7350) 에서의 리파아제 제조

27℃에서 다음의 조성을 갖는 배지가 있는 셰이크 플라스크에서 균주를 배양하였다.

파마메디아	20 g/l
옥수수침지분말	6.64 g/l
글리세롤	10 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/l
조조바유	1 ml/shake flask
pH 조절	6.0

4일후에, 수율은 약 30LI/ml이었다.

실시예 5

리파아제의 정제

S. griseus LB 501(DSM 7349)의 정제하지 않은 리파아제는 다음과 같이 소수성 크로마토그래피법에 이어 이온 교환 크로마토 그래피법에 의해 정제하였다.

소수성 크로마토그래피법: 실시예 1에서 제조된 정제하지 않은 리파아제 분말은 3.5M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 에 녹였고 조절하였다. 이것을 t- 부틸 마크로젤 HIC(Biorad 제품) 컬럼에 걸었고 컬럼은 대부분의 색소와 단백질을 제거하기 위해 같은 농도의 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 로 세척하였다.

그후 구비를 개시하였는데 처음에 1M까지는 빠르게 내려갔고 다음 0M까지는 느리게 내려갔다.

크로마토그램 상에서 2개의 피크를 볼 수 있고 따라서 2개의 리파아제 풀을 모았다.

리파아제 활성의 전체 회수율은 80% 이상이었다.

이온 교환 크로마토그래피법: 한외 여과법(60-70%의 회수율, 고점도에 기인)에 의해 농축하고 탈이온화한후 각 풀은 DEAE-Toyopearl 컬럼에 걸었다.

리파아제 활성을 포함하는 한개의 넓은 피크를 크로마토그램상에서 볼 수 있고 이것을 농축하였다. 일부색소가 제거되었고 리파아제 활성의 회수율은 80% 이상이었다.

최종적으로 각 풀을 다시 한외 여과시켰다(80%이상의 회수율).

출발물질의 전체 리파아제 활성은 16,500LU 이었다. 풀 1및 2의 특이적 리파아제 활성은 74.4LU/mg단백질 및 43.3LU/mg단백질이었고 전체 리파아제 활성은 각각 3350LU 및 1860LU이었다.

그러므로, 리파아제 활성의 전체 회수율은 32%이었다.

양 풀은 5.5이하의 등전점(등전점 전기영동법에 의함) 및 28 내지 43kd의 분자량을

갖는 적어도 2개의 리파아제를 포함하는 것으로 발견되었다.

실시예 6

리파아제 제제의 pH 활성 곡선

pH 프로파일은 다음 균주로부터 리파아제 제제에 대해 결정하였다:

S. griseus LB 501 (DSM 7349)

S. griseus LB 502 (DSM 7350)

S. coelicolor LB 511 (FERM BP-4236)

S. coelicolor LB 512 (FERM BP-4237)

S. griseus LB 524 (DSM 8672)

S. coelicolor N 2293 (ATCC 23899)

S. parvus N 2300 (ATCC 12433)

pH 8.5-10.5의 글리신 완충액을 사용하여 20분 반응시간동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 PVA를 가지고 40℃에서 Ca^{++} 의 부제하에 리파아제 제제의 pH 프로파일을 결정하였다. 그 결과는 제 1도 내지 제 7도에서 pH 에 대한 상대 활성도 (%rel.) 로 제시하였다.

리파아제는 약 pH 9-10에서 Ca^{++} 의 부제하에 최적 활성을 나타내고, pH 10 에서 최적 활성의 50%이상인 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

실시예 7

알칼리 pH 에서의 리파아제 활성

pH 6-10에서 리파아제 활성을 알아보기 위해서 확산 플레이트법에 의해 리파아제 제제를 시험하였다.

실시예 3에서 3및 4일의 배양후에 얻은 리파아제 제제를 시험하였다. 확산 플레이트는 각각 pH 6, 8.5 및 10 에서 올리브유 및 PVA를 포함하는 시험배지를 사용하여 VO 88/02775의 실시예11에 기술된 것과같이 준비하였고, 배지의 pH 에서 리파아제 활성의

존재나 부재는 투명영역의 출현으로 결정하였다.

결과는 실시예 3에서 제조된 모든 리파아제 제제가 pH 6, 8.5 및 10 에서 활성을 나타내는데 즉 이것은 pH 10까지의 높은 pH 에서 모두 활성이 있다는 것을 보여준다.

실시예 8

위치 특이성

위치 특이성은 본 발명의 리파아제 제제에 의한 트리글리세리드의 가수분해와 이때 형성된 디글리세리드의 분석에 의해 결정하였다.

S. griseus LB 502(DSM 7350)으로부터의 리파아제 제제는 30분동안 pH 10인 글리신 완충액에서 유화제인 PVA를 가지고 기질인 올리브유의 가수분해에 사용하였고, 이후 가수분해 산물을 라트로스캔에 의해 분석하였다.

Humicola lanuginosa로부터 유래된 공지기술의 위치 특이적 리파아제 제제인 리폴라제를 비교용으로 사용하였다.

결과는 제 8도에서 보여준다. 본 발명의 리파아제 제제로 1,2- 디글리세리드보다 더 많은 1,3- 디글리세리드가 형성되었는데, 이것은 제제가 트리글리세리드의 1- 및 3-위치에 비해 2- 위치에서 더 높은 활성을 갖는 위치 비특이적이라는 사실을 나타낸다. 리폴라제는 1,3- 디글리세리드를 거의 형성하지 않는데 이것은 위치 특이적, 즉 리폴라제는 트리글리세리드의 1- 및 3- 위치에서만 반응한다는 것을 증명한다.

S. griseus LB 524(DSM 8672), S. coelicolor N 2293(ATCC 23899) 및 S. parvus N 2300(ATCC 12433)

에서 얻은 본 발명의 리파아제 제제는 LB 502 에서와 유사한 결과를 낳았다.

실시예 9

리파아제 활성에 대한 세제의 효과

여러 리파아제 제제의 리파아제 활성은 pH 7.5 에서 0.1% 의 비이온성 또는 음이온성 계면활성제(알콜 에톡실레이트 또는 선형알킬 벤젠 설포네이트) 의 존재하에 측정하였고, 세제가 없는 대조군과 비교하였다.

실시에 2의 리파아제 제제를 사용하였다. 각 테스트에서 0.1ml의 리파아제용액은 0.2M Tris-HCl(pH 7.5)에 있는 1.0mM P- 니트로페닐부티르산염 용액 0.4ml과 0.2% 세제용액 0.5ml 로 혼합하였다.

대조군은 세제용액 대신 물로 만들었다.

이 혼합물은 40 °C에서 30분간 배양하였고 가수분해의 정도는 415nm에서 광학농도의 측정에 의해 결정하였다.

결과는 대조군과 비교하여 세제존재하의 상대 활성도로 표현하였다.

종	균주	세제존재하의 상대활성도	
		알콜 에톡실레이트	선형 알킬 벤젠설포네이트
<i>S. griseus</i>	LB 501 (DSM 7349)	55 %	75 %
<i>S. griseus</i>	LB 502 (DSM 7350)	>100 %	>100 %
<i>S. griseus</i>	LB 524 (DSM 8672)	100 %	97 %
<i>S. coelicolor</i>	LB 511 (FERM BP-4236)	100 %	21 %
<i>S. coelicolor</i>	LB 512 (FERM BP-4237)	87 %	50 %
<i>S. coelicolor</i>	ATCC 23899	95 %	75 %
<i>S. parvus</i>	ATCC 12433	97 %	>100 %

알콜 에톡실레이트의 존재하에 모든 리파아제 제제는 리파아제 활성의 50% 이상을

보유하고, 대부분은 75%이상을 보유하며, 어떤 것은 90%이상을 보유한다는 것을 알 수 있다.

선형 알킬벤젠 설포네이트의 존재하에 대부분의 리파아제 제제는 리파아제 활성의 적어도 50%를 보유하고, 대부분은 적어도 75%, 및 어떤 것은 90% 이상을 보유한다.

실시예10

세제에서의 리파아제 활성

여러 리파아제 제제의 리파아제 활성은 높은 pH 에서 발더첨가 세제용액에서 측정 하였고 세제가 없는 대조군과 비교하였다.

각 테스트에서 리파아제 제제는 다음 조성(활성제로 표시됨)의 세제용액에 첨가 하였다.

혼합물은 기질로서 올리브유 및 유화제로서 PVA를 사용하여 40℃에서 60분간 배양하였고 이후 형성된 유리지방산의 양을 결정하였다. 대조군은 세제용액 대신 같은 pH 에서 글리신 또는 디에탄올 완충액으로 만들었다.

선형 알킬벤젠설포네이트(Nansa 1169/P)	0.35 g/l
알콜 에톡실레이트(Dobanol 25-7)	0.15 g/l
삼인산나트륨(STPP)	1.25 g/l
황산나트륨	1.00 g/l
탄산나트륨	0.45 g/l
메타규산나트륨	0.15 g/l
pH	10.2

결과는 대조군과 비교하여 세제 존재하의 상대 활성도로 표현하였다.

종	균주	세제용액에서의 상대활성도	대조군에 사용한 완충액
<i>S. griseus</i>	LB 502 (DSM 7350)	67 %	디에탄올아민
<i>S. griseus</i>	LB 524 (DSM 8672)	76 %	글리신
<i>S. coelicolor</i>	ATCC 23899	96 %	디에탄올아민
<i>S. parvus</i>	ATCC 12433	73 %	디에탄올아민

상기의 리파아제 제제는 대조군에 비해 세제용액에서 50%이상의 상대활성도를 갖는다는 것을 알 수 있다.

실시예11

리파아제 활성에 대한 Ca^{++} 의 효과

본 발명의 리파아제 제제의 활성은 Ca^{++} 의 첨가없이 및 여러농도의 Ca^{++} 을 첨가하여 측정하였다.

S. griseus LB 502(DSM 7350)으로 부터의 리파아제 제제는 pH 10의 디에탄올 아민 완충액에서 기질로서 올리브유 및 유화제로서 PVA를 사용하여 40℃에서 10 분간 배양하였고, 이후 가수분해 정도를 결정하였다. 실험은 여러농도의 칼슘염을 첨가해서 반복하였다.

결과는 제 9도에 나타내었다. Ca^{++} 의 농도가 낮아질때 본 제제의 리파아제 활성은 감소하지 않는다는 것을 알 수 있다.

미 생 물	
상세한 설명 <u>2</u> 페이지 <u>17</u> 행의 미생물과 관련한 선택 용지 ¹	
A. 기탁의 확인 ² 다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 <input checked="" type="checkbox"/> ³	
기탁기관명칭 ⁴ DSM 도이체 잠룽 본 마이크로오르가니즈멘 운트 겔쿨루텐 게엠베아	
기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함) ⁴ 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉴트오테르 베크 1번	
기탁일 ⁵ 1992년12월10일	수탁번호 ⁶ DSM 7349
B. 추가지시 ⁷ (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 <input type="checkbox"/>	
유럽 및/ 또는 오스트레일리아 특허가 청구되는 지정국에서는 유럽 특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날 까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙 28(4)/ 오스트레일리아 1991 년 제정 규칙 No71 의 3.25 규정) 에 의해서 지정된 전문가에게만 가능하다.	
C. 지시가 적용될 지정국가 ⁹ (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)	
D. 지시의 별도 제공 ⁸ (적용되지 않을 경우 공란)	
이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임 ⁹ (예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)	
E. <input type="checkbox"/> 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)	
_____ (담당자)	
<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터) ¹⁰	
_____ (담당자)	

미 생 물

상세한 설명 2 페이지 18 행의 미생물과 관련한 선택 용지 1

A. 기탁의 확인 2

다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 ☒ 3

기탁기관명칭 4

DSM 도이체 잠동 본 마이크로오르가니즈먼 운트 겔쿨루렌 게엠베아

기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함) 4

독일연방공화국 테-38124 브라운쉬바이크 마쉴트오데르 베크 1베

기탁일 5

1992년 12월 10일

수탁번호 6

DSM 7350

B. 추가지시 7 (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 ☐

유럽 및/ 또는 오스트레일리아 특허가 청구되는 지정국에서는 유럽
특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날
까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙
28(4)/ 오스트레일리아 1991 년 제정 규칙 No71 의 3.25 규정) 에 의해서
지정된 전문가에게만 가능하다.

C. 지시가 적용될 지정국가 3 (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)

D. 지시의 별도 제공 8 (적용되지 않을 경우 공란)

이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임 9 (예를들면,
기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)

E. ☐ 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)

(담당자)

☐ 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터) 10

(담당자)

<h2 style="margin: 0;">미 생 물</h2>	
<p>상세한 설명 <u>2</u> 페이지 <u>18</u> 행의 미생물과 관련한 선택 용지¹</p>	
<p>A. 기탁의 확인² 다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 <input checked="" type="checkbox"/>³</p>	
<p>기탁기관명칭⁴ 생명공학 공업기술연구소</p>	
<p>기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함)⁴ 일본국 305 이바라기켄 즈쿠바시 히가시 1초메 1반 3고 동상산업성 공업기술원</p>	
<p>기탁일⁵ _____ 1993년 3월10일</p>	<p>수탁번호⁶ FERM BP-4236</p>
<p>B. 추가지시⁷ (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 <input type="checkbox"/></p>	
<p>유럽 및/ 또는 오스트레일리아 특허가 청구되는 지정국에서는 유럽 특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날 까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙 28(4)/ 오스트레일리아 1991 년 제정 규칙 No71 의 3.25 규정) 에 의해서 지정된 전문가에게만 가능하다.</p>	
<p>C. 지시가 적용될 지정국가⁹ (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)</p>	
<p>D. 지시의 별도 제공⁸ (적용되지 않을 경우 공란)</p>	
<p>이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임⁹ (예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)</p>	
<p>E. <input type="checkbox"/> 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)</p> <div style="text-align: right; margin-right: 100px;"> _____ (담당자) </div> <p><input type="checkbox"/> 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터)¹⁰</p> <div style="text-align: right; margin-right: 100px;"> _____ (담당자) </div>	

미 생 물	
상세한 설명 <u>2</u> 페이지 <u>19</u> 행의 미생물과 관련한 선택 용지 ¹	
A. 기탁의 확인 ² 다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 <input checked="" type="checkbox"/> ³	
기탁기관명칭 ⁴ 생명공학 공업기술연구소	
기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함) ⁴ 일본국 305 이바라기켄 즈루바시 히가시 1쵸메 1반 3고 <div style="text-align: right;">동상산업생 공업기술원</div>	
기탁일 ⁵ 1993년 3월10일	수탁번호 ⁶ FERM BP-4237
B. 추가지시 ⁷ (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 <input type="checkbox"/>	
유럽 및/ 또는 오스트레일리아 특허가 청구되는 지정국에서는 유럽 특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날 까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙 28(4)/ 오스트레일리아 1991 년 제정 규칙 No71 의 3.25 규정) 에 의해서 지정된 전문가에게만 가능하다.	
C. 지시가 적용될 지정국가 ³ (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)	
D. 지시의 별도 제공 ⁸ (적용되지 않을 경우 공란)	
이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임 ⁹ (예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)	
E. <input type="checkbox"/> 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)	
_____ (담당자)	
<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터) ¹⁰	
_____ (담당자)	

<h2 style="margin: 0;">미 생 물</h2>	
<p>상세한 설명 <u>2</u> 페이지 <u>19</u> 행의 미생물과 관련한 선택 용지¹</p>	
<p>A. 기탁의 확인² 다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 <input checked="" type="checkbox"/>³</p>	
<p>기탁기관명칭⁴ DSM 도이체 잠룡 본 마이크로오르가니즈먼 운트 겔쿨루텐 게엠베아</p>	
<p>기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함)⁴ 독일연방공화국 테-38124 브라운쉬바이크 마쉐트오데트 베크 1번</p>	
<p>기탁일⁵ 1993년 11월 2일</p>	<p>수탁번호⁶ DSM 8672</p>
<p>B. 추가지시⁷ (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 <input type="checkbox"/></p>	
<p>유럽 및/ 또는 오스트레일리아 특허가 청구되는 지정국에서는 유럽 특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날 까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙 28(4)/ 오스트레일리아 1991 년 제정 규칙 No71 의 3.25 규정) 에 의해서 지정된 전문가에게만 가능하다.</p>	
<p>C. 지시가 적용될 지정국가³ (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)</p>	
<p>D. 지시의 별도 제공⁸ (적용되지 않을 경우 공란)</p>	
<p>이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임⁹ (예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)</p>	
<p>E. <input type="checkbox"/> 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 접점함)</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>_____</p> <p>(담당자)</p> </div> <p><input type="checkbox"/> 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터)¹⁰</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>_____</p> <p>(담당자)</p> </div>	

특허청구의 범위

1. 1) 위치 비특이적이고,

2) 40℃에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용한 Ca^{++} 없는 분석에서 최적 pH 및 pH 10 에서의 두 활성을 측정했을때, pH 10 에서 최적 pH 에서의 활성의 50%이상인 활성을 가지며, 및

3) Streptomyces 1군 군주의 배양에 의해 생성될 수 있는 리파아제 제제.

2. 제 1항에 있어서, 군주는 S. coelicolor, S. limosus, S. albobiridis, S. griseus,

S. parvus, S. setonii 또는 S. nitrosporeus인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

3. 제 2항에 있어서, 군주는 S. coelicolor FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899,

S. limosus ATCC 19778, S. albobiridis ATCC 25425, S. griseus ATCC 23345, DSM 7349, DSM

7350, DSM 8872, S. parvus ATCC 12433, S. setonii ATCC 25497 또는 S. nitrosporeus

ATCC 27472인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

4. 제 1항에 있어서, 60분 반응시간동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용하여 두 활성을 측정하고, 세제용액이 선형 알킬 벤젠 설포네이트

0.35g/ℓ, 알콜 에톡실레이트 0.15g/ℓ, 삼인산나트륨 1.25g/ℓ, 황산나트륨 1.00g/ℓ,

탄산나트륨 0.45g/ℓ 및 메타규산나트륨 0.15g/ℓ으로 구성될때, pH 10.2 인 세제용액에서 pH 10 인 디에탄올 아민 완충액에서의 활성의 50%이상인 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

5. 제 4항에 있어서, 군주는 Streptomyces 아군 1A 또는 1B 의 군주인 것을 특징으로

하는 리파아제 제제.

6. 제 5항에 있어서, 군주는 S. griseus, S. coelicolor 또는 S. parvus인 것을 특징으로

하는 리파아제 제제.

7. 제 6항에 있어서, 균주는 S. griseus DSM 7349, DSM 7350, DSM 8672, S. coelicolor FERM

BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899 또는 S. parvus ATCC 12433 인 것을 특징을 하는

리파아제 제제.

8. 제 4항에 있어서, pH 10 에서 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알코올을 사용하여 두 활성을 측정했을때 Ca^{++} 의 부재하에서 50mM Ca^{++} 존재하에서의 활성의 50%이상인 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

9. 제 8항에 있어서, 균주는 S. griseus DSM 7350인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

10. 전항의 어느 한항에 있어서, 리파아제 제제가 비분말 과립, 안정화된 액체, 슬러리 또는 보호된 효소의 형태로 세제첨가제로서 제공되는 것을 특징으로하는 리파아제 제제.

11. 1)위치 비특이적이고,

2)40℃에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알코올을 사용하여 측정했을때 pH 9-11의 범위에서 최적 활성을 가지며,

3)Streptomyces 1군 균주에 고유한 세포외의 리파아제와 면역학적으로 동일하거나

부분적으로 동일한 리파아제.

12. 제 6항의 리파아제 제제를 생성할 수 있는 Streptomyces griseus 균주.

13. 제12항에 있어서, 상기 리파아제 제제를 생성할 수 있는 S. griseus DSM 7350 또는

이들의 돌연변이체나 변이체인 것을 특징으로 하는 Streptomyces griseus 균주.

14. 탄소원, 질소원 및 무기염을 포함하는 적당한 영양배지에서 리파아제 생성균주인

Streptomyces 1군 균주의 배양과 이후 리파아제제제의 회수로 이루어지는 것을

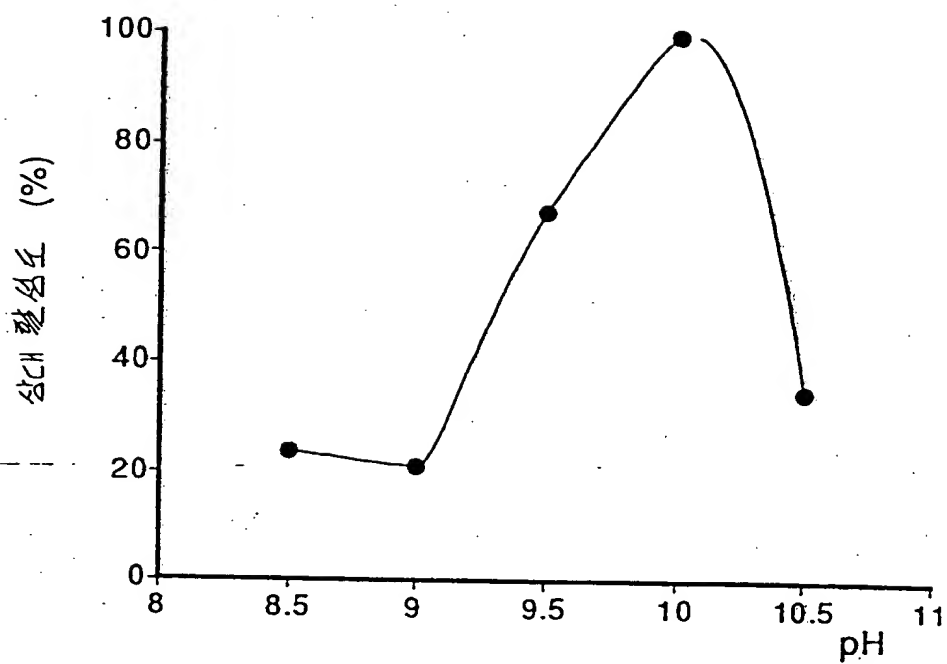
- 특징으로 하는 제 1항 내지 제10항중 어느 한항에 따른 리파아제 제제의 제조방법.
15. 제14항에 있어서, 균주는 S. coelicolor, S. limosus, S. albobiridis, S. griseus,
S. parvus, S. setonii 또는 S. nitrosporeus인 것을 특징으로 하는 방법.
16. 제15항에 있어서, 균주는 S. coelicolor FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899,
S. limosus ATCC 19778, S. albobiridis ATCC 25425, S. griseus ATCC 23345, DSM 7349,
DSM 7350, DSM 8672, S. parvus ATCC 12433, S. setonii ATCC 25497 또는 S. nitrosporeus
ATCC 27472 또는 이들의 리파아제- 생성 변이체이거나 돌연변이체인 것을 특징으로
하는 방법.
17. 계면활성제와 제 1항 내지 제10항중 어느 한항의 리파아제 제제로 이루어지는 세제
조성물.
18. 제17항에 있어서, 세제빌더들 1~40% 더 포함하고, 수용액에서 측정했을때 pH 7 ~11을
나타내는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.
19. 제18항에 있어서, 빌더가 인산염 빌더, 제올라이트 또는 시트르산 나트륨인 것을
특징으로 하는 세제 조성물.
20. 제17항 내지 제19항중 어느 한항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제, 옥시다제
및 퍼옥시다제로 구성되는 군에서 선택된 추가의 세제효소를 더 포함하는 것을
특징으로 하는 세제 조성물.

요 약 서

고 알칼리성, 위치 비특이적인 리파아제를 Streptomyces 1군의 균주로부터 얻을 수 있다.

Streptomyces 1군 균주는 이제까지 리파아제를 생산하는 것으로 알려지지 않았다.

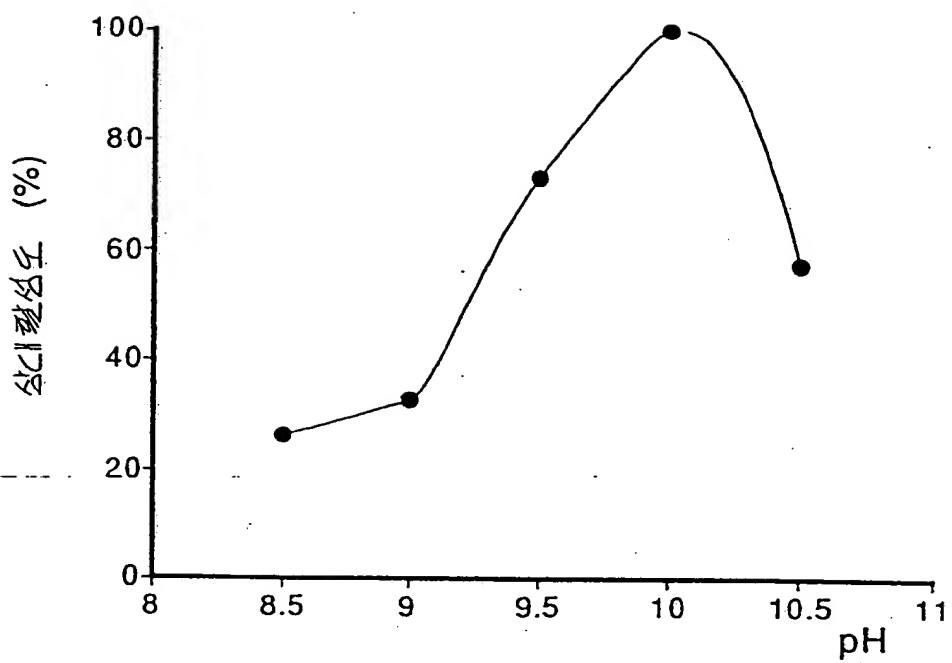
리파아제 제제는 pH 10에서 최적 활성의 50%이상인 활성을 갖고 예들들어 세제에 유용하다.



LB 501 리파아제의 pH 프로파일

Fig. 1

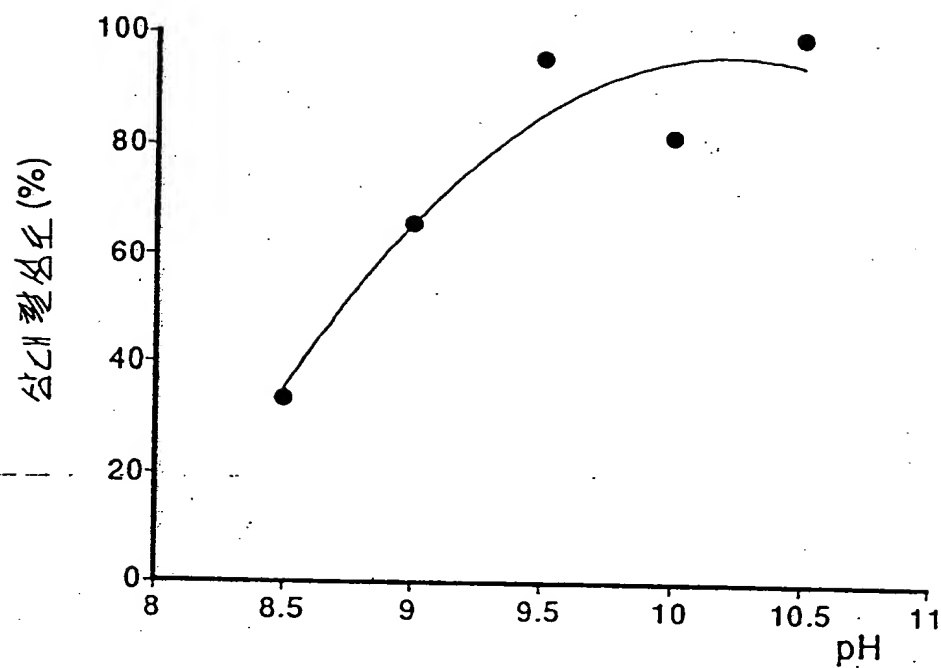
9 - 1



LB 502 리파아제의 pH 프로파일

Fig. 2

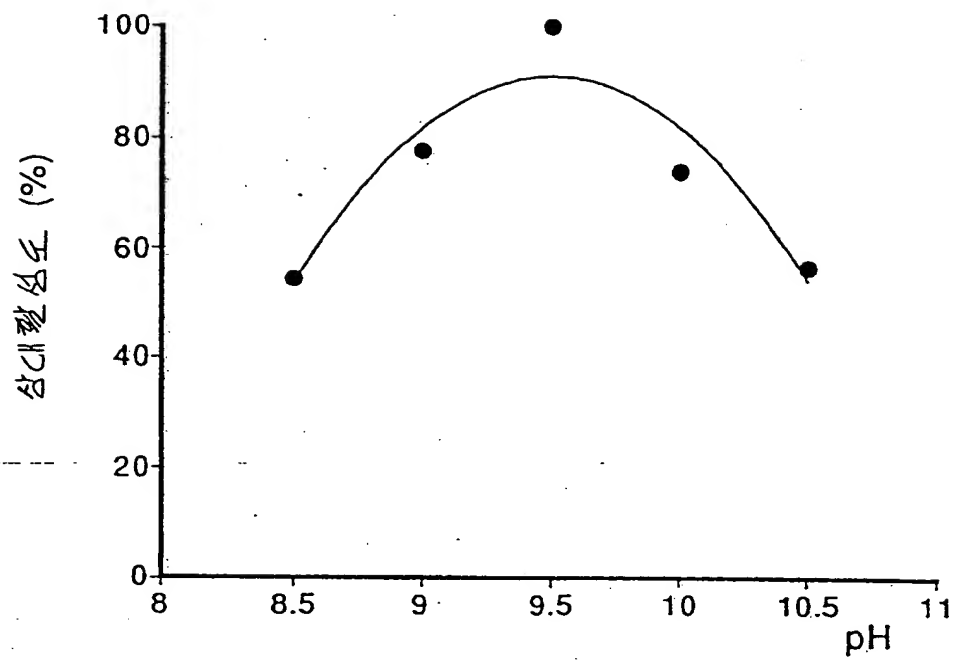
9 - 2



LB 511 리파아제의 pH 프로파일

Fig. 3

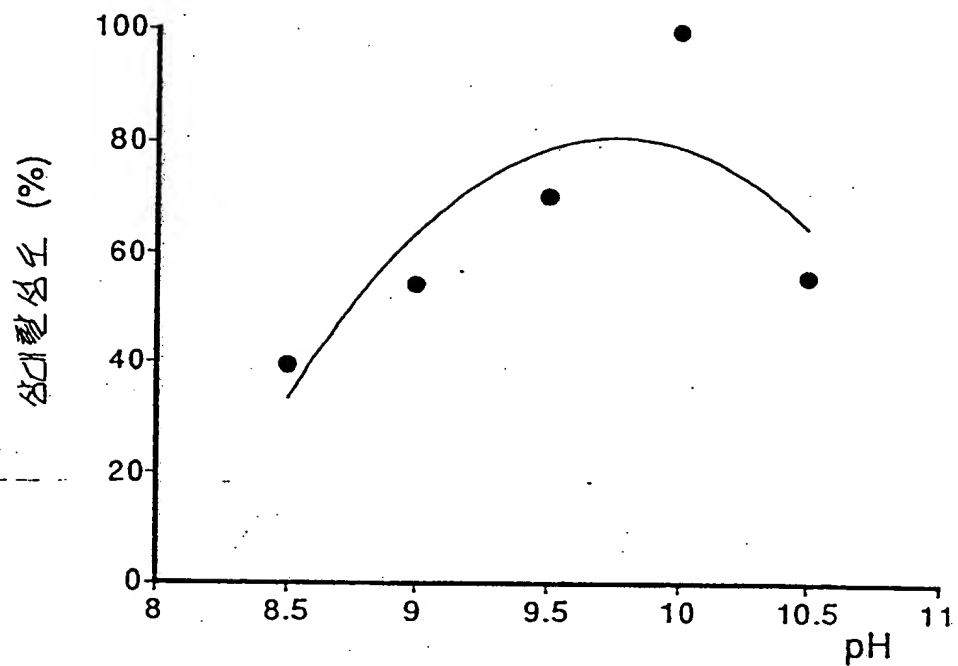
9-3



LB5/2 리파아제의 pH 프로파일

Fig. 4

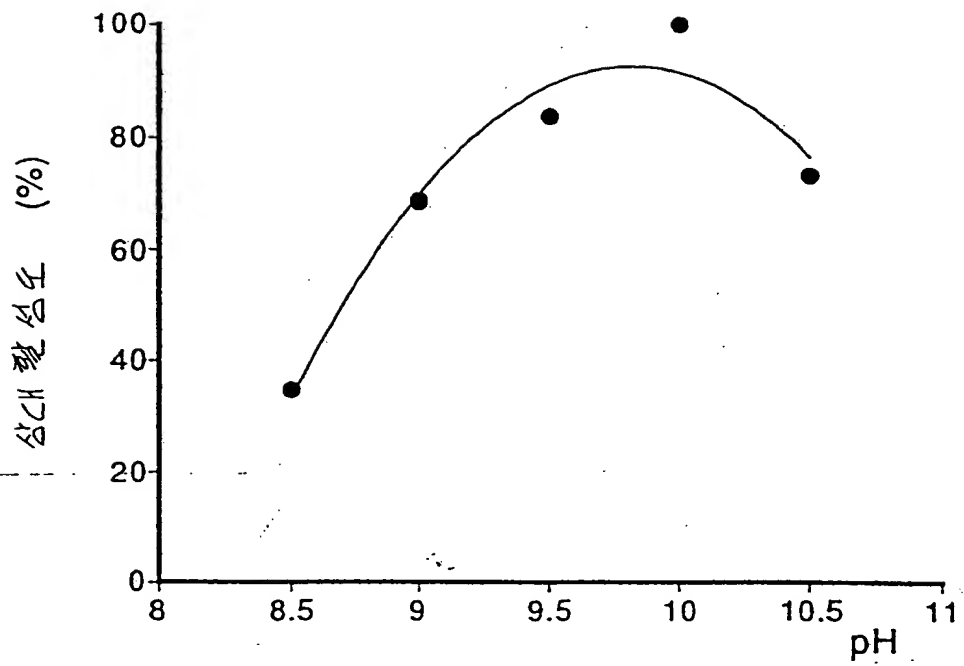
9-4



LB 524 리파아제의 pH 프로파일

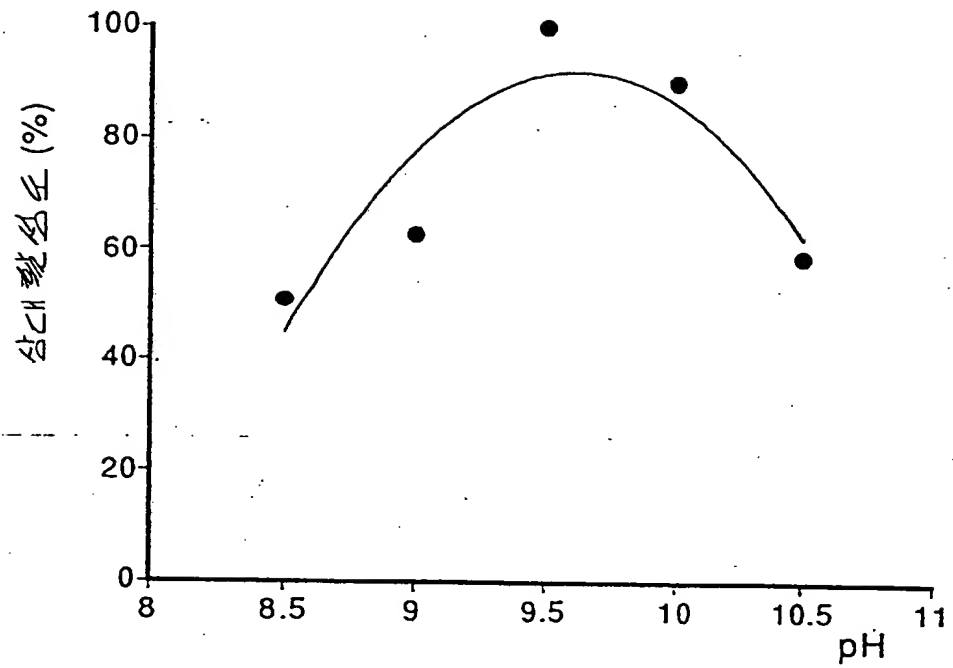
Fig. 5

9-5



ATCC 23899 리파아제의 pH 프로파일

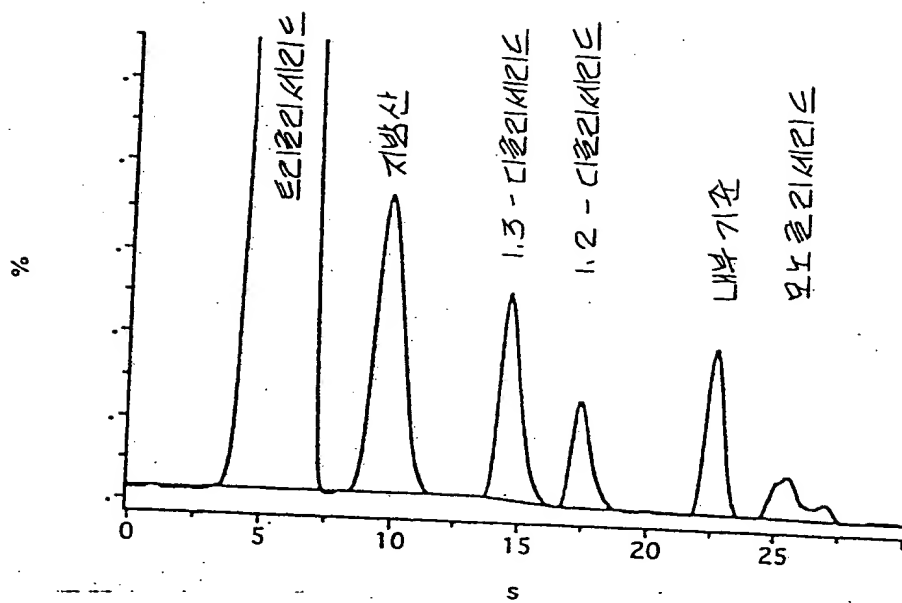
Fig. 6



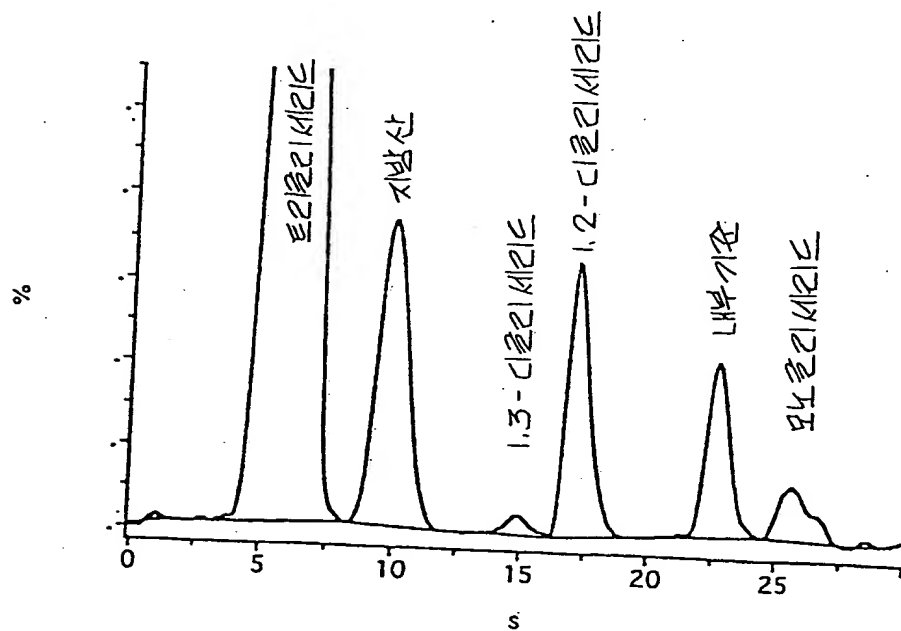
ATCC 12433 리파아제의 pH 프로파일

Fig. 7

9-9



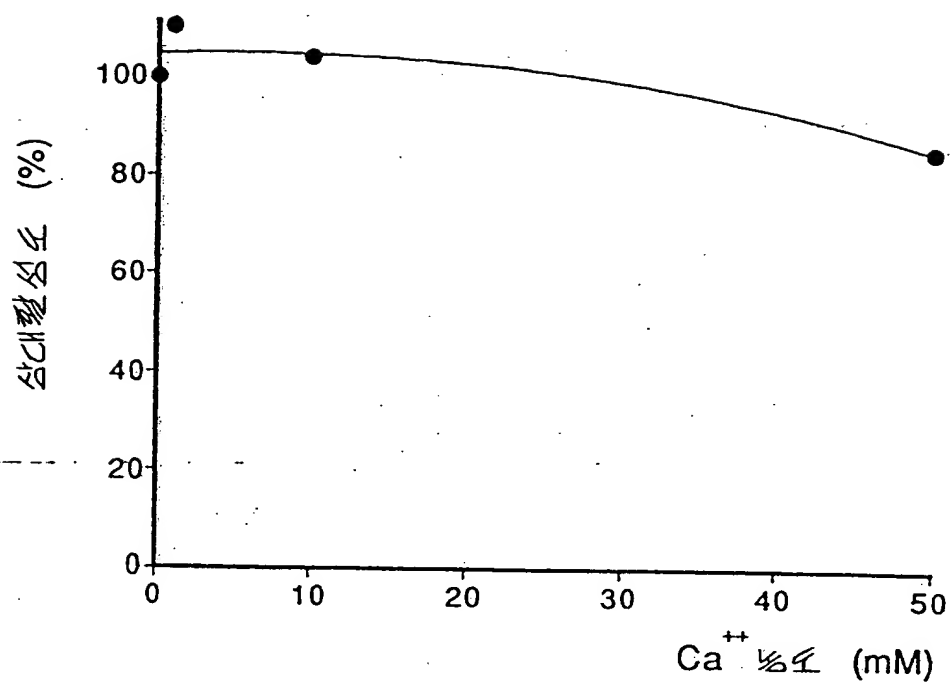
LB502 리파아제



리플라제

라트루스캔 크로마토그램

Fig. 8



LB 502 세균에 대한 Ca의 효과

Fig. 9

9-9

Y. S. CHANG & ASSOCIATES
K.P.O. Box 136, Seoul 110, Korea

POWER OF ATTORNEY

I/We, the undersigned, Novo Nordisk A/S

whose address is Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, Denmark


hereby appoint Mr. Yong Shik CHANG, Jinsang JEONG
registered Patent Attorney(s) in Seoul, Korea, as my/our attorney, with full power of substitution
and revocation, to file with the Korean Industrial Property Office application(s) for the registration
of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark entitled

.....
Alkaline lipase

.....
(PCT/DK93/00442)

and further empower the said attorney(s) to file amendment, petition for the examination,
withdrawal, abandonment or alteration of application, divisional application, withdrawal of
application for the registration of extension of the patent term, and withdrawal of demands or
requests, to make claim or withdrawal of the priority under Article 55-1 of the Patent Law
(inclusive of application mutatis mutandis under Article 11 of the Utility Model Law), to file
recordal of alteration of address or name of the applicant(s), transfer of right, opposition, trial,
retrial, appeal against final rejection of application, decision for dismissing amendment or decision
in the first trial, and renewal application, to raise petition or administrative suit against any
administrative disposition of the Commissioner, to pay annuities or taxes, to represent me/us in a
litigation relating to the protection of industrial property or civil affairs, to do all lawful acts with
and without relation to the justice that shall be taken at the court of justice or administrative
authorities for the defense against infringements of industrial property, and to register as an
administrator of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark under Article 5 of
the Patent Law, before and after the registration of such right(s).

This..... 11th day of..... May 19 95

Signed by: 

(in block letters)..... Anne Secher

Title: Director, Corporate Patents

Novo Nordisk A/S

(No legalization required)

NZAS-0025194

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) ノボノルディスクバイオインダストリー株式会社
寄託者 会社 代表取締役社長 カーステン・アイザー・ニールセン 殿
あて名 ⑦ 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3
新張テクノガーデンCB6

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) LB 511	(受託番号) FERM BP- 4236
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 5 年 3 月 10 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 鈴木 龍夫 Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN</p>	
平成 5 年 (1993) 3 月 10 日	

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則10.2に従い
発行される

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

生存に関する証明書

申請者 氏名 (名称) ノボノルディスクバイオインダストリー株式
会社 代表取締役社長 カーステン・アイザ
殿
あて名 ⑤
千葉県千葉市美浜区中瀬1-3
幕張テクノガーデンCB6

I. 寄託者		II. 微生物の表示	
氏名 (名称)	ノボノルディスクバイオインダストリー株式 会社 代表取締役社長 カーステン・アイザ	受託番号:	FERM BP- 4236
あて名 ⑤	千葉県千葉市美浜区中瀬1-3 幕張テクノガーデンCB6	受託の日:	平成 5年 3月10日
III. 生存試験の結果			
<p>II 欄の微生物の生存について 平成 5年 5月 17日に試験を実施した結果、当該微生物は、</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 生存していた。</p> <p><input type="checkbox"/> 生存していなかった。</p>			
IV. 生存試験に際して使用した条件 (結果が否定的である場合のみ)			
<input type="checkbox"/> 微生物条件記録書の写し 1通			
V. 国際寄託当局			
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency of Science and Technology</p> <p>所長 鈴木 博 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県丁目1番3号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>			
平成 5年 (1993) 6月 1日			

국제서식

[특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약]

하기 국제기탁 당국에 의하여 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 대한 수탁증

명 칭: 노보 노르디스크 바이오 인더스트리
가부시키가이샤

대표자 가스텐 아이자

기탁자

주 소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리
테크노 가덴 CB 6

I. 미생물의 표시	
(기탁자가 부여한 식별표시) LB 511	(수탁번호) FERM BP-4236
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
제 I난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다. ■ 과학적 성질 ■ 분류학상의 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제 기탁 당국은 1993년 3월 10일 (원기탁일) 에 수령한 제 I 난의 미생물을 수탁한다.	
IV. 국제 기탁 당국	
<p>통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소</p> <p>명칭: 소장 오사무 스즈키 주소: 일본국 305 이바라기켄 즈쿠바시 히가시 1초메 1번 3고</p> <p>1993년 3월 10일</p>	

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

하기 국제기탁 기관에 의하여 규칙 제10.2에 따라 발행된
원기탁에 의한 생존 증명서

명 칭: 노보 노트디스크 바이오 인더스트리
가부시킴가이사

대표자 가스텐 아이자

기탁자

주 소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리
테크노 가덴 CB 6

I. 기탁자	II. 미생물의 표시
명칭: 노보 노트디스크 바이오 인더스트리 가부시킴가이사	수탁번호: FERM BP-4236
주소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리 테크노 가덴 CB 6	수탁일: 1993년 3월 10일

III. 생존시험결과

상기 II에서 확인된 미생물의 생존력을 1993년 5월17일 행하였다.

그 당시 상기 미생물은

(X) 생존중

() 더이상 생존하지 않음

IV. 생존력 시험이 행해진 조건(시험결과 부정적인 경우 작성)

☐ 미생물 조건기록서 사본 1통

V. 국제 기탁 당국

통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소

명칭: 소장 오사무 스즈키

주소: 일본국 305 이바라기켄 즈쿠바시 히가시 1초메 1반 3고

1993년 6월 1일

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) ノボノルディスクバイオインダストリー株式
会社 代表取締役社長 カーステン・アイザー・
寄託者 ニールセン 殿
あて名 ⑤
千葉県千葉市美浜区中瀬1-3
郡張テクノガーデンCB6

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

LB 512

(受託番号)

FERM BP- 4237

II. 科学的性質及び分類学上の位置

〔欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。〕

☒ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 5 年 3 月 10 日 (原寄託日) に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 鈴木

Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305. JAPAN

平成 5 年 (1993) 3 月 10 日

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則10.2に従い
発行される

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

生存に関する証明書

氏名 (名称) ノボノルディスクバイオインダストリー株式
会社 代表取締役社長 カーステン・アイザ
申請者
あて名 ⑤
千葉県千葉市美浜区中瀬1-3
幕張テクノガーデンCB6

I. 寄託者		II. 微生物の表示	
氏名 (名称) ノボノルディスクバイオインダストリー株式 会社 代表取締役社長 カーステン・アイザ あて名 ⑤ 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3 幕張テクノガーデンCB6		受託番号: FERM BP- 4237 受託の日: 平成 5年 3月10日	
III. 生存試験の結果			
Ⅰ Ⅱの微生物の生存について 平成 5年 5月 17日に試験を実施した結果、当該微生物は、 <input checked="" type="checkbox"/> 生存していた。 <input type="checkbox"/> 生存していなかった。			
IV. 生存試験に際して使用した条件 (結果が否定的である場合のみ)			
<input type="checkbox"/> 微生物条件記録書の写し 1通			
V. 国際寄託当局			
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Science and Human-Technology Agency of Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 5年 (1993) 6月 1日			

국제서식

[특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약]

하기 국제기탁 당국에 의하여 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 대한 수탁증

명 칭: 노보 노트디스크 바이오 인더스트리
가부시키가이샤

대표자 가스텐 아이자

기탁자

주 소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리
테크노 가덴 CB 6

I. 미생물의 표시	
(기탁자가 부여한 식별표시) LB 512	(수탁번호) FERM BP-4237
II. 과학적 성질 및/ 또는 분류학상의 위치	
제 I 단의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다. ■ 과학적 성질 ■ 분류학상의 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제 기탁 당국은 1993년 3월 10일 (원기탁일) 에 수령한 제 I 단의 미생물을 수탁한다.	
IV. 국제 기탁 당국	
<p>통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소</p> <p>명칭: 소장 오사무 스즈키 주소: 일본국 305 이바라기켄 즈쿠바시 히가시 1초메 1번 3고</p> <p>1993년 3월10일</p>	

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

하기 국제기탁 기관에 의하여 규칙 제10.2에 따라 발행된
원기탁에 의한 생존 증명서

명 칭: 노보 노르디스크 바이오 인더스트리
가부시키가이샤

대표자 가스텐 아이자

기탁자

주 소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리
테크노 가덴 CB 6

I. 기탁자	II. 미생물의 표시
명칭: 노보 노르디스크 바이오 인더스트리 가부시키가이샤	수탁번호: FERM BP-4237
주소: 일본국 치바시 미하마구 나카세 1-3 마주하리 테크노 가덴 CB 6	수탁일: 1993년 3월 10일

III. 생존시험결과

상기 II에서 확인된 미생물의 생존력을 1993년 5월17일 행하였다.

그 당시 상기 미생물은

(X) 생존중

() 더이상 생존하지 않음

IV. 생존력 시험이 행해진 조건 (시험결과 부정적인 경우 작성)

☐ 미생물 조건기록서 사본 1통

V. 국제 기탁 당국

동상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소

명칭: 소장 오사무 스즈키

주소: 일본국 305 이바라기엔 즈쿠바시 히가시 1초메 1번 3고

1993년 6월 1일

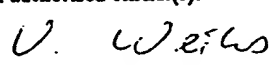
위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Novo Nordisk A/S
Novo Allé
DK-2880 Bagsvaerd

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR LB 524	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 8672
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1993-11-02 (Date of original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorised official(s):  Date: 1993-11-04

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Novo Nordisk A/S
Novo Allé
DK-2880 Bagsvaerd

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10:2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Novo Nordisk A/S Novo Allé Address: DK-2880 Bagsvaerd	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 8672 Date of the deposit or of the transfer ¹ : 1993-11-02
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1993-11-02 ² On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1993-11-04

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

「 노보 노트디스크 아크티에 셀스카브 덴마아크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레 」	하기 국제기탁 기관에 의하여 규칙 제7.1 에 따라 발행된 원기탁에 의한 수탁증
---	--

I. 미생물의 표시

기탁자가 부여한 식별표시: LB 524	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: DSM 8672
--------------------------	-------------------------------

II. 과학적 성질 및/ 또는 분류학상의 위치

상기 제 I난에 표시된 미생물의 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다.

() 과학적 성질

() 분류학상의 위치

III. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 기관은 1993년 11월 2일 (원기탁일¹) 자로 상기 제 I 난에 표시된 미생물을 수탁한다.

IV. 전환 청구의 수령

본 국제기탁당국은 년 월 일 (원기탁일) 에 상기 제 I난에 표시된 미생물을 수령하였으며 년 월 일 (전환청구의 수령일) 에 원기탁을 부다페스트 조약상에 기탁으로 전환시키려는 청구를 수령하였다.

V. 국제 기탁 기관

명칭: DSM 도이쎈 잠풍 본 미크로오르가니즈멘 운트 겔쿨트렌 게엠베하 주소: 독일연방공화국 테-38124 브라운 쉬바이크 마쉴트오데트 베크 1배	국제기탁 당국을 대표하는 것으로 위임받은 담당자의 서명. 1993년 11월 4일
---	---

¹ 규칙 6.4(d)가 적용될 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 지위 취득일이다.

서식 BP/4 (1면)

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

수신
 노보 노르디스크 아크티에 하기 국제기탁 기관에 의하여
 셀스카브 규칙 제10.2에 따라 발행된
 덴마크 디케이-2880 박스베르트 원기탁에 의한 생존 증명서
 노보 알려

I. 기탁자	II. 미생물의 확인
명칭: 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브	국제기탁당국이 부여한 수탁번호: DSM 8672
주소: 덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알려	기탁일 ¹ : 1993년 11월 2일

III. 생존력 보고서
상기 II에서 확인된 미생물의 생존력을 1993년 11월 2일 행하였다. ² 그 당시 상기 미생물은 (X) ³ 생존중 () ³ 더이상 생존하지 않음
IV. 생존력 시험이 행해진 조건 ⁴

IV. 국제 기탁 당국	
명칭: DSH 도이체 잡통 본 미크로오르가니즈멘 운트 겔쿨트렌 게엠베하	국제기탁 당국을 대표하는 것으로 위임받은 담당자의 서명.
주소: 독일연방공화국 데-38124 브라운 슈바이크 마쉴트오데르 베르크 1번	1993년 11월 4일

- 1 원기탁일, 또는 새로운 기탁 또는 이전이 있는 경우에는 가장 최근의 관련일 (새로운 기탁일 또는 이전일).
- 2 규칙 10.2(a)(ii) 및 (iii)에 규정된 경우인 때는 가장 최근의 생존력 시험.
- 3 해당되는 괄호에 X 표시를 한다.
- 4 정보가 요구되고 시험결과 부정적인 경우 작성한다.

위 번역문은 원문과 상위없음
 변리사 장 용 식

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DUPLIKAT

INTERNATIONAL FORM

Novo Nordisk Bioindustry Ltd.
Makuhari Techno Garden CB-6
3, Nakase 1-chome, Mihama-ku
Chiba-shi 261-01
Japan

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR LB 501	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 7349
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1992-12-10 (Date of original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Adress: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>U. W. W.</i> Date: 1992-12-16

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

NZAS-0025207

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

<p>노보 노트디스크 바이오 인더스트리 엘티디 일본국 261-01 치바시 미하마구 나카세 1-3 마쿠하리 테크노 가든 CB-6</p>	<p>하기 국제기탁 기관에 의하여 규칙 제7.1 에 따라 발행된 원기탁에 의한 수탁증</p>
--	---

I. 미생물의 표시

기탁자가 부여한 식별표시:
LB 501

국제기탁기관이 부여한 수탁번호:
DSM 7349

II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치

상기 제 I난에 표시된 미생물의 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다.

- () 과학적 성질
() 분류학상의 위치

III. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 기관은 1992년 12월 10일 (원기탁일¹) 자로 상기 제 I 난에 표시된 미생물을 수탁한다.

IV. 전환 청구의 수령

본 국제기탁당국은 년 월 일 (원기탁일) 에 상기 제 I난에 표시된 미생물을 수령하였으며 년 월 일 (전환청구의 수령일) 에 원기탁을 부다페스트 조약상에 기탁으로 전환시키려는 청구를 수령하였다.

V. 국제 기탁 기관

명칭: DSM 도이체 잠동 본
미크로오르가니즈멘 운트
젤쿨트렌 게엠베하

주소: 독일연방공화국 데-3300 브라운
쉬바이크 마쉴트오데트 베크 1배

국제기탁 당국을 대표하는
것으로 위임받은 담당자의
서명.

1993년 12월 16일

¹ 규칙 6.4(d)가 적용될 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 지위 취득일이다.

서식 BP/4 (1면)

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DUPLIKAT

INTERNATIONAL FORM

Novo Nordisk Bioindustry Ltd.
Makuhari Techno Garden CB-6
3, Nakase 1-chome, Mihama-ku
Chiba-shi 261-01
Japan

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR LB 502	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 7350
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1992-12-10 (Date of original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weiler</i> Date: 1992-12-16

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

특허수속상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국 제 서 식

<p>「 노보 노트디스크 바이오 인더스트리 엘티디 일본국 261-01 치바시 미하마구 나카세 1-3 마쿠하리 테크노 가든 CB-6 」</p>	<p>하기 국제기탁 기관에 의하여 규칙 제7.1 에 따라 발행된 원기탁에 의한 수탁증</p>
--	---

I. 미생물의 표시

기탁자가 부여한 식별표시: LB 502	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: DSM 7350
--------------------------	-------------------------------

II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치

상기 제 I난에 표시된 미생물의 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다.

- () 과학적 성질
- () 분류학상의 위치

III. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 기관은 1992년 12월 10일 (원기탁일¹) 자로 상기 제 I 난에 표시된 미생물을 수탁한다.

IV. 전환 청구의 수령

본 국제기탁당국은 년 월 일 (원기탁일) 에 상기 제 I난에 표시된 미생물을 수령하였으며 년 월 일 (전환청구의 수령일) 에 원기탁을 부다페스트 조약상에 기탁으로 전환시키려는 청구를 수령하였다.

V. 국제 기탁 기관

<p>명칭: DSM 도이체 잠풍 본 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소: 독일연방공화국 데-3300 브라운 쉬바이크 마쉴트오데르 베크 1배</p>	<p>국제기탁 당국을 대표하는 것으로 위임받은 담당자의 서명. 1993년 12월 16일</p>
---	---

¹ 규칙 6.4(d)가 적용될 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 지위 취득일이다.

서식 BP/4 (1면)

위 번역문은 원문과 상위없음
변리사 장 용 식

TRANSLATION

AMENDMENT (Under Art. 205(1) of the Law)				
Filed by	Name	NOVO NORDISK A/S		
	Relation to the case	Applicant	Nationality	DENMARK
	Address	Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark		
Attorney	Y. S. Chang & J. S. Jeong			
International Application Number	PCT/DK93/00442			
International Application Date	Dec. 22, 1993			
Title of Invention	Alkaline Lipase			
International Filing Date of Amendment	Jan. 9, 1995			
<p>We are filing this Amendment pursuant to Article 115 of the Enforcement Regulation of the Korean Patent Law.</p> <p style="text-align: right;">June 22, 1995</p> <p style="text-align: right;">Y. S. Chang Patent Attorney J. S. Jeong Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>				
Attached Document	1. Translation of Amendment Original 1 copy Duplicate 1 copy			

NZAS-0025211

보정된 특허청구의 범위

1. 1) 위치 비특이적이고,

2) 40℃에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알코올을 사용한 Ca^{++} 없는 분석에서 최적 pH 및 pH 10 에서의 두 활성을 측정했을때, pH 10 에서 최적 pH 에서의 활성의 50%이상인 활성을 가지며, 및

3) Streptomyces 1군 군주의 배양에 의해 생성될 수 있는 리파아제 제제.

2. 제 1항에 있어서, 군주는 S. coelicolor, S. limosus, S. albobiridis, S. griseus,

S. parvus, S. setonii 또는 S. nitrosporeus인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

3. 제 2항에 있어서, 군주는 S. coelicolor FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899,

S. limosus ATCC 19778, S. albobiridis ATCC 25425, S. griseus ATCC 23345, DSM 7349, DSM

7350, DSM 8672, S. parvus ATCC 12433, S. setonii ATCC 25497 또는 S. nitrosporeus

ATCC 27472인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

4. 제 1항에 있어서, 60분 반응시간동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐

알코올을 사용하여 두 활성을 측정하고, 세제용액이 선형 알킬 벤젠 설포네이트

0.35g/ℓ, 알콜 에톡실레이트 0.15g/ℓ, 삼인산나트륨 1.25g/ℓ, 황산나트륨 1.00g/ℓ,

탄산나트륨 0.45g/ℓ 및 메타규산나트륨 0.15g/ℓ으로 구성될때, pH 10.2 인 세제용액에서

pH 10 인 디에탄올 아민 완충액에서의 활성의 50%이상인 활성을 갖는 것을 특징으로

하는 리파아제 제제.

5. 제 4항에 있어서, 군주는 Streptomyces 아군 1A 또는 1B 의 군주인 것을 특징으로

하는 리파아제 제제.

6. 제 5항에 있어서, 군주는 S. griseus, S. coelicolor 또는 S. parvus인 것을 특징으로

하는 리파아제 제제.

7. 제 6항에 있어서, 균주는 S. griseus DSM 7349, DSM 7350, DSM 8672, S. coelicolor FERM

BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899 또는 S. parvus ATCC 12433 인 것을 특징을 하는

리파아제 제제.

8. 제 4항에 있어서, pH 10 에서 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을

사용하여 두 활성을 측정했을때 Ca^{++} 의 부재하에서 50mM Ca^{++} 존재하에서의 활성의

50%이상인 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

9. 제 8항에 있어서, 균주는 S. griseus DSM 7350인 것을 특징으로 하는 리파아제 제제.

10. 전항의 어느 한항에 있어서, 리파아제 제제가 비분말 과립, 안정화된 액체, 슬러리

또는 보호된 효소의 형태로 세제첨가제로서 제공되는 것을 특징으로하는 리파아제

제제.

11. 1)위치 비특이적이고,

2)40℃에서 20분동안 기질로서의 올리브유 및 유화제로서의 폴리비닐 알콜을 사용한

Ca^{++} 없는 분석에서 측정했을때 pH 9-11의 범위에서 최적 활성을 가지며,

3)Streptomyces 1군 균주에 고유한 세포외의 리파아제와 면역학적으로 동일하거나

부분적으로 동일한 리파아제.

12. 제 6항의 리파아제 제제를 생성할 수 있는 Streptomyces griseus 균주.

13. 제12항에 있어서, 상기 리파아제 제제를 생성할 수 있는 S. griseus DSM 7350 또는

이들의 돌연변이체나 변이체인 것을 특징으로 하는 Streptomyces griseus 균주.

14. 탄소원, 질소원 및 무기염을 포함하는 적당한 영양배지에서 리파아제 생성균주인

Streptomyces 1군 균주의 배양과 이후 리파아제제제의 회수로 이루어지는 것을

특징으로 하는 제 1항 내지 제10항중 어느 한항에 따른 리파아제 제제의 제조방법.

15. 제14항에 있어서, 균주는 S. coelicolor, S. limosus, S. albobiridis, S. griseus,

S. parvus, S. setonii 또는 S. nitrosporeus인 것을 특징으로 하는 방법.

16. 제15항에 있어서, 균주는 S. coelicolor FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899,

S. limosus ATCC 19778, S. albobiridis ATCC 25425, S. griseus ATCC 23345, DSM 7349,

DSM 7350, DSM 8672, S. parvus ATCC 12433, S. setonii ATCC 25497 또는 S. nitrosporeus

ATCC 27472 또는 이들의 리파아제- 생성 변이체이거나 돌연변이체인 것을 특징으로

하는 방법.

17. 계면활성제와 제 1항 내지 제10항중 어느 한항의 리파아제 제제로 이루어지는 세제 조성물.

18. 제17항에 있어서, 세제빌더를 1~40% 더 포함하고, 수용액에서 측정했을때 pH 7 ~11을

나타내는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

19. 제18항에 있어서, 빌더가 인산염 빌더, 제올라이트 또는 시트르산 나트륨인 것을

특징으로 하는 세제 조성물.

20. 제17항 내지 제19항중 어느 한항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제, 옥시다제

및 퍼옥시다제로 구성되는 군에서 선택된 추가의 세제효소를 더 포함하는 것을

특징으로 하는 세제 조성물.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.